

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica**

Ruany Cristyne de Oliveira Silva

***Avaliação Funcional de Variantes da Região Longa de
Controle (LCR) do Papilomavírus Humano 31***

**Recife
2018**

Ruany Cristyne de Oliveira Silva

Avaliação Funcional de Variantes da Região Longa de Controle (LCR) do Papilomavírus Humano 31

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientador: Dr. Antonio Carlos de Freitas

Coorientadores: Dra. Bárbara Simas Chagas
Dra. Rita de Cássia Pereira de Lima

Recife

2018

Catálogo na fonte
Elaine C. Barroso (CRB4/1728)

Silva, Ruany Cristyne de Oliveira

Avaliação funcional de variantes da Região Longa de Controle (LCR)
do Papilomavírus humano 31 / Ruany Cristyne de Oliveira Silva- 2018.

56 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Antônio Carlos de Freitas

Coorientadoras: Bárbara Simas Chagas e Rita de Cássia Pereira
Lima

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em
Inovação Terapêutica. Recife, 2018.

Inclui referências

1. Papilomavírus humano 2. Câncer cervical 3. Região Longa de
Controle I. Freitas, Antônio Carlos de (orient.) II. Chagas, Bárbara
Simas (coorient.) III. Lima, Rita de Cássia Pereira (coorient.) IV. Título

616.911

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-444

Folha de Aprovação

Ruany Cristyne de Oliveira Silva

Avaliação Funcional de Variantes da Região Longa de Controle (LCR) do Papilomavírus Humano 31

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovada em: 21/02/2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antonio Carlos de Freitas
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Assinatura: _____

Prof. Dr. Jacinto da Costa Silva Neto
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Assinatura: _____

Dr. Marcelo Nazário Cordeiro
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir alcançar mais uma vitória e nunca me deixar só nos momentos mais difíceis.

A minha família, especialmente minha mãe Josiane de Oliveira, meu pai Miguel Natanael e meu irmão Miguel Júnior por todo o apoio, incentivo e orações.

Ao meu esposo Alexson, pela dedicação, carinho e amor.

Ao meu orientador Dr. Antonio Carlos de Freitas, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por todo incentivo na realização das pesquisas.

As minhas coorientadoras Dra. Bárbara Simas e a Dra. Rita de Cássia pelo apoio, ensinamento e amizade de suma importância para a realização desse trabalho.

Ao Dr. Lindomar Pena por ter possibilitado a realização de todo trabalho de cultivo das células no LAVITE.

A todos os amigos do LEMTE e do LAVITE, vocês são fundamentais, pois os amigos fazem parte das nossas conquistas.

Ao Programa de Pós Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT).

Ao secretário Paulo Germano (PPGIT), pelas inestimáveis ajudas com a burocracia acadêmica.

A plataforma de sequenciamento (Heidi).

Aos órgãos de fomento: Capes, CNPq e FACEPE, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O câncer cervical representa o quarto tipo de neoplasia mais frequente entre as mulheres no mundo. Embora, o HPV-16 seja o mais prevalente na população mundial, o HPV-31 é encontrado em diversos países sendo também um importante agente do processo carcinogênico. Infecções persistentes causadas por Papilomavírus humano de alto risco oncogênico (HR HPVs) é uma condição necessária, porém não suficiente para o desenvolvimento de lesões cervicais e câncer cervical. Fatores ambientais e genéticos estão envolvidos na carcinogênese cervical. Dentre os fatores genéticos, as variantes genéticas dos HR HPVs parecem estar relacionadas com o risco de infecções persistentes. Assim, o presente estudo realizou uma avaliação funcional de variantes da região promotora (LCR) do HPV-31 com a finalidade de verificar o efeito biológico sobre essas variantes e consequente importância clínica com relação à sua oncogenicidade. Para isso, a amplificação e clonagem das variantes A e C (isolados 21, 66 e 89), o regulador transcricional E2 e protótipo (HPV-31 – J04353.1) foram realizadas, seguida pela subclonagem em vetor de expressão em células de mamífero. Os recombinantes foram sequenciados para confirmar a LCR clonada. Uma cultura de células HeLa foi estabelecida e a transfecção com diferentes concentrações de E2 foi feita e se determinou que a concentração de 25 ng é a ideal para ativação da LCR. Posteriormente uma transfecção conjunta de E2 e cada recombinante de LCR foi realizada para se avaliar a atividade da LCR de cada isolado. Dentre os isolados estudados, o 21(apresentando lesão de alto grau - neoplasia intraepitelial cervical grau - NIC - II) e 89 (apresentando lesão de alto grau -NIC- III) possuem uma LCR com maior capacidade de alterar os níveis de expressão do gene-repórter *Nluc* e o isolado 66 (apresentando lesão de alto grau - NIC - III) apresentou os níveis de expressão do gene-repórter *Nluc* diminuídos comparado com o controle (LCR- protótipo). A análise estatística mostrou diferença significativa entre as regiões LCR polimórficas e o controle (LCR do HPV-31 sem nenhuma variação) com valor de $p < 0.0001$. Assim começa a ser traçado um perfil mais refinado de variantes do HPV-31 e sua importância para o prognóstico de lesões cervicais.

Palavras-chave: HPV-31. Região Longa de Controle (LCR). Luciferase.

ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most common form of cancer among women worldwide. Although HPV-16 is the most prevalent in the world population, HPV-31 is found in several countries and is also an important agent of the carcinogenic process. Persistent infection caused by the oncogenic high risk Human Papillomavirus ((HR HPVs) is one of the requirements, although not by itself enough, for the development of cervical lesions and cervical cancer. Furthermore, environmental and genetic factors are involved on the cervical carcinogenesis. Amongst the genetic factors, genetic variants of the high risk HPVs seem to be related with the risk of persistent infections and the development of cervical cancer. Therefore, this study made a functional evaluation of variants of the promoting region (LCR) of HPV-31 with the intent of verifying the biological effect on these variants and consequent clinical importance in relation to their oncogenicity. For that, it was necessary to amplify and clone the variants A and C (isolated 21, 66, 89), the transcriptional regulator E2 and the prototype (HPV-31 – J04353.1), followed by the subcloning in an expression vector from mammal cells. The recombinants were sequenced to confirm the cloned LCR. A culture of HeLa cells was established and transfection with different concentrations of E2 was done and the 25 ng concentration was determined to be ideal for LCR activation. Subsequently a combined transfection of E2 and each LCR recombinant was performed to evaluate the LCR activity of each isolate. Amongst the studied isolates, the 21 (presenting the high degree lesion – cervical intraepithelial degree - NIC- II) and 89 (presenting high degree lesion – NIC – III) present a LCR with higher capacity to alter the expression levels of the reporter gene Nluc and the isolate 66 (presenting high degree lesion – NIC – III) has the levels of the expression of the reporter gene Nluc diminished compared with the control (LCR – prototype). The statistical analysis showed a significant difference between the polymorphic LCR regions and the control with the value of $p < 0.0001$. Therefore, a more refined profile begins to be set for the variants of HPV-31 and its importance for the prognosis of cervical lesions.

Key words: HPV-31. Long Control Region (LCR). Luciferase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Progressão do câncer cervical pelo Papilomavírus Humano (HPV). Por meio das microlesões, o vírus tem acesso às células da camada basal do epitélio cervical. Nas camadas superiores do epitélio ocorre a replicação do genoma viral e formação de novas partículas virais que são liberadas podendo iniciar uma nova infecção e, posteriormente poderá ocorrer a progressão para o câncer invasivo. 16
- Figura 2** - Representação esquemática do genoma do HPV evidenciando os genes de expressão precoce (E), tardia (L), região regulatória (LCR), os promotores (P97, P670, PE8) e os locais de poliadenilação precoce (pAE) e tardia (pALs). 18
- Figura 3** - Árvore filogenética da família *Papillomaviridae*. (*) Indica que alguns membros do clado ainda não foram reconhecidos como *Gammapapillomavirus*. 20
- Figura 4** - Árvore filogenética mostrando os tipos representativos com linhagens variantes e sublinhagens no grupo alpha-9. 21
- Figura 5** - Esquema do ciclo infeccioso a partir da infecção pelo HPV. 23
- Figura 6** - Representação esquemática da LCR. A figura mostra os segmentos 5', região central e o segmento 3' da LCR. 25
- Figura 7** - Árvore filogenética de variantes do HPV-31 com base na região reguladora LCR (*Long Control Region*). 30
- Figura 8** - Mapa do vetor pNL1.1 33
- Figura 9** - Representação esquemática do processo que antecede a etapa da transfecção 35
- Figura 10** - Representação esquemática da primeira etapa da transfecção. A: Todos os seis poços foram co-transfectados com o protótipo, renilla e o regulador transcricional E2 do HPV- 31 nas concentrações de 10 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng e 300ng. B: A placa B representa o controle do experimento, realizado com a presença do protótipo e o plasmídeo expressando Renilla luciferase como normalizador da luminescência. Todas as condições dos experimentos A e B foram feitas em duas triplicatas. 36
- Figura 11** - Representação esquemática da segunda etapa da transfecção. A: Todos os seis poços foram co-transfectados com os isolados (regiões LCR polimórficas) separadamente, juntamente com um plasmídeo expressando Renilla e o regulador transcricional E2 na concentração de 25 37

ng. B: Placa representando um dos controles com a presença do protótipo e um plasmídeo expressando Renilla. C: O controle realizado com o protótipo, Renilla e E2.

Figura 12 - Gel representativo demonstrando a amplificação da região LCR variante com o uso de *primers* específicos LCR do HPV-31. C: Controle negativo; M: Marcador ((GeneRuler 1 KB DNA Ladder- Thermo Scientific); 1, 2 e 3: amplificação da região LCR dos isolados 21, 66 e 89. 38

Figura 13 - Confirmação da clonagem LCR HPV-31 variantes por digestão no pGEM-T easy. M: Marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder- Thermo Scientific); 1, 2 e 3: Digestão enzimática com liberação do vetor e inserto(região LCR dos isolados 21, 66 e 89) através das enzimas XhoI (Temperatura ótima 37°C, Promega) e HindIII (Temperatura ótima 37°C, Promega). 39

Figura 14 - Confirmação da clonagem LCR HPV-31 variantes por digestão no pNL1.1. M: Marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder- Thermo Scientific); 1, 2 e 3: Digestão enzimática com liberação do vetor e inserto(região LCR dos isolados 21, 66 e 89) através das enzimas XhoI (Temperatura ótima 37°C, Promega) e HindIII (Temperatura ótima 37°C, Promega). 39

Figura 15 - Grupo de células HeLa foram co-transfectadas com a LCR protótipo do HPV-31, o plasmídeo Renilla e com o plasmídeo contendo o regulador transcricional E2 na concentração de 10ng, 25ng, 50ng, 100ng e 300ng. Após quarenta e oito horas da transfecção as células foram lisadas e os extratos celulares foram preparados para leitura da luciferase de *NanoLuc* e *renilla*. 40

Figura 16 - Grupo de células HeLa foram co-transfectadas com a LCR polimórfica do HPV-31, ou com a LCR protótipo do HPV-31, o plasmídeo Renilla e com o plasmídeo contendo o regulador transcricional E2 na concentração de 25 ng apenas nas LCRs polimórficas. Após quarenta e oito horas da transfecção as células foram lisadas e os extratos celulares foram preparados para leitura da luciferase de *NanoLuc* e *renilla*. 42

Figura 17 - Grupo de células HeLa foram co-transfectadas com a LCR polimórfica do HPV-31, ou com a LCR protótipo do HPV-31, o plasmídeo Renilla e com o plasmídeo contendo o regulador transcricional E2 na concentração de 25 ng em todas as condições. Após quarenta e oito horas da transfecção as células foram lisadas e os extratos celulares foram preparados para leitura da luciferase de *NanoLuc* e *renilla*. 43

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância unidirecional
AP1	Proteína Ativadora 1
ASC-H	Células escamosas
ASC-US	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
BPV	<i>Bovine Papillomavirus</i>
COPV	<i>Canine Oral Papillomavirus</i>
CRPV	<i>Cottontail Rabbit Papillomavirus</i>
DMEM	Meio Dulbecco's Modified Eagle's
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
E	Early
E5	Oncogene E5
E6	Oncogene E6
E7	Oncogene E7
HeLa	Queratinócitos derivados de adenocarcinoma de colo uterino
HPV	Papilomavírus humano
<i>HSIL</i>	Lesão epitelial escamosa de alto grau
HSPGs	Receptores heparon sulfato
hTERT	Telomerase reversa humana
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L	Late
LCR	Longa região de controle
<i>LSIL</i>	Lesão intraepitelial de baixo

NF-1	Fator nuclear 1
NIC	Neoplasia intra-epitelial
OMS	Organização mundial de saúde
ORF	Open reading frame
pAE	Sinal de poliAdenilação precoce
Pb	Pares de bases
PE	Pernambuco
PV	Papilomavírus
RNA	Ácido ribonucleico
SP1	Fator transcricional promotor seletivo 1
YY1	Fator yin-yang

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1 CÂNCER CERVICAL E A INFECÇÃO PELO HPV.....	15
2.2 ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL.....	17
2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS PAPILOMAVÍRUS.....	18
2.4 INFECÇÃO PELO HPV.....	22
2.5 REGIÃO LONGA DE CONTROLE (LCR) E OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO.....	24
3 OBJETIVOS.....	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS ESTUDADAS.....	29
4.2 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES LCR VARIANTES E PROTÓTIPO.....	31
4.3 CLONAGEM DOS PRODUTOS DE PCR.....	31
4.4 REAÇÃO DE DIGESTÃO DO DNA PLASMIDIAL.....	32
4.5 SUBCLONAGEM DAS VARIANTES DA REGIÃO LCR E PROTÓTIPO.....	32
4.6 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS <i>E. COLI</i>	33
4.7 SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS.....	34
4.8 ISOLAMENTO DO DNA DOS VETORES RECOMBINANTES EM LARGA ESCALA (MAXI-PREPARAÇÃO).....	34
4.9 CULTIVO E TRANSFEÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS.....	34
4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIRIGIDA PELA LCR POLIMÓRFICA DOS HPV-31.....	37
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
5 RESULTADOS.....	38

5.1 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES LCRS DO HPV-31.....	38
5.2 CLONAGEM, SUBCLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS SEQUÊNCIAS VARIANTES DA REGIÃO LCR DO HPV- 31.....	38
5.3 TRANSFEÇÃO <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS.....	39
5.4 ENSAIOS DE LUCIFERASE.....	40
6 DISCUSSÃO.....	44
7 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

O câncer cervical representa o quarto tipo de neoplasia mais frequente entre as mulheres no mundo, com aproximadamente 530 mil casos novos diagnósticos a cada ano, ocasionando 270 mil óbitos. No Brasil, em 2016, estimou-se a ocorrência de 16.340 novos casos, com uma aferição de 15.85 casos a cada 100 mil mulheres. No Nordeste do Brasil, este câncer ocupa a segunda posição em incidência de casos, com taxas de 19.49 para cada 100 mil habitantes, perdendo apenas para o Norte do país. Pernambuco apresenta uma taxa bruta de 20.23 novos casos, enquanto, Recife especificamente, apresenta taxa bruta de 17.74 novos casos, superando a taxa nacional.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a infecção persistente pelo Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco é o principal fator de risco para o desenvolvimento de câncer cervical, onde estima-se que cerca de 98% dos tumores do colo do útero estão associados com os HPVs de alto risco. A contribuição da infecção por HPV na patogênese cervical está relacionada com o tipo de HPV e o período de replicação do vírus nas células epiteliais da zona de transformação do colo do útero.

Mais de 200 tipos de HPV têm sido identificados e cerca de 40 tipos acometem o trato genital, sendo 15 deles considerados como HPV de alto risco oncogênico (HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, HPV-35, HPV-39, HPV-45, HPV-51, HPV-52, HPV-56, HPV-58, HPV-59, HPV-68, HPV-73 e HPV-82), seis são considerados HPV de baixo risco oncogênico (HPV-6, HPV-11, HPV-42, HPV-44, HPV-81 e HPV-83) e três são considerados como HPV de risco intermediário (HPV-26, HPV-53 e HPV-66). O HPV-16 é considerado o responsável por 50 a 60% dos casos de câncer cervical, seguido pelo HPV-18 (10-12%), e os HPVs 31 e 45 (4-5% cada).

Estudos realizados com relação à prevalência do HPV em lesões cervicais no Brasil mostram que o HPV-16 é o tipo predominante em algumas cidades das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul do país, embora existam variações regionais com relação aos outros tipos. Desta forma, os dados de um local não podem ser generalizados para todo o país. No estudo realizado em amostras de mulheres com

lesão cervical em Recife (PE) foi evidenciado que o HPV-16 é o tipo mais frequente detectado, seguido pelos tipos HPV-31, HPV-33, HPV-58, e em menor frequência o HPV-18. Confirmando que na população de Recife o HPV-31 possui uma alta incidência (15,49%) quando comparado com o HPV-18 (2,82%) e o HPV-33 (2,82%). A acurada informação sobre a distribuição dos genótipos de HPV com base na população é muito importante para o rastreamento primário do câncer cervical e confecção de vacinas profiláticas.

Variantes intratipo de HPV são definidas como tendo mais do que 98% de identidade de sequência nucleotídica determinada sobre as ORFs (*Open Reading Frames*) E6, E7 e L1 com a sequência de referência, assim chamada de protótipo. Variações da região LCR (*Long Control Region*) do HPV podem influenciar a progressão do câncer cervical e resultar na perda da capacidade de ligação dos fatores transcricionais E2, YY1, NF-1, AP1. Nesta perspectiva, estudos têm sugerido que variações na LCR conferem um aumento no risco de infecções persistentes causadas pelos tipos de HPVs 16, 18, 33 e 58. Além disso, outros estudos têm mostrado que as variantes não europeias estão associadas ao maior risco de desenvolvimento de lesões de alto grau de displasia. Apesar da importância do conhecimento da variabilidade genética da região LCR em diferentes populações, existem poucos estudos desenvolvidos no mundo e são raros os que avaliam amostras brasileiras.

O presente trabalho visa realizar uma avaliação funcional de variantes presentes na região promotora (LCR) do HPV-31 com a finalidade de identificar o potencial real dessas variantes e a importância clínica com relação à oncogenicidade do câncer de colo uterino em mulheres residentes do estado de Pernambuco.

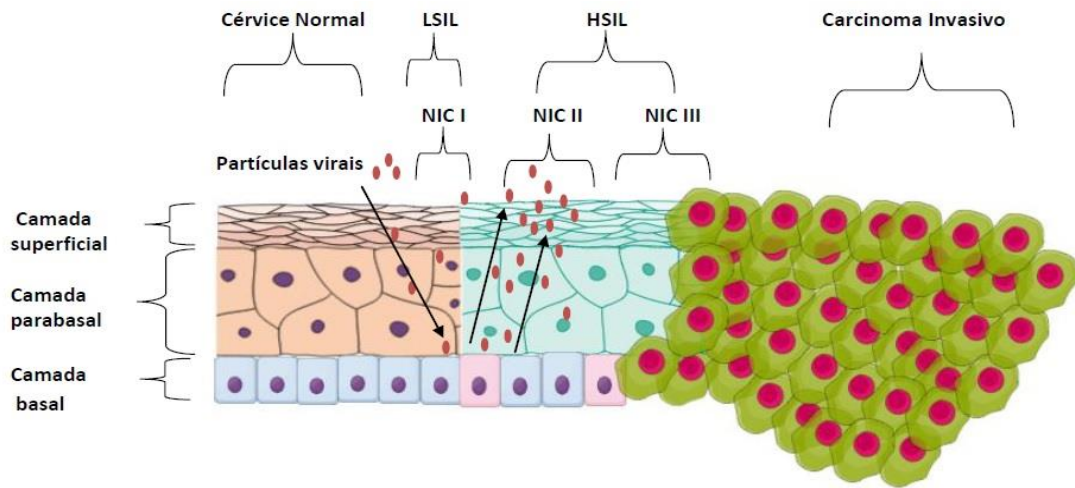
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER CERVICAL E A INFECÇÃO PELO HPV

A cada ano, mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer, podendo aumentar para 21 milhões em 2030 (WHO, 2017). O câncer cervical é a quarta causa de morte em todo o mundo, com diagnóstico de 530.000 casos e 270.000 mortes por ano (WHO, 2015). No Brasil, é o terceiro mais comum, precedido apenas pelo câncer de mama e o colorretal, com uma estimativa de 16.340 casos no ano de 2016, com uma aferição de 15.85 casos a cada 100 mil mulheres. O Nordeste, ocupa a segunda posição em incidência de casos, com taxas de 19.49 para cada 100 mil habitantes, perdendo apenas para o Norte do país. O estado de Pernambuco apresenta uma taxa bruta de 20.23 novos casos, enquanto, Recife especificamente, apresenta taxa bruta de 17.74 novos casos, superando a taxa nacional (INCA, 2017).

O câncer cervical evolui a partir de lesões pré-malignas não invasivas, denominadas neoplasias intraepiteliais cervicais – NIC (*cervical intraepithelial neoplasia-CIN*) ou lesão intraepitelial escamosa (*squamous intraepithelial lesions-SIL*). As lesões podem ser suspeitadas através de exame citológico das células cervicais esfoliadas e confirmadas pelo exame histológico. As alterações histológicas são classificadas com base na morfologia e o grau progressivo das células epiteliais: em NIC I - displasia média; NIC II - displasia moderada e NIC III - displasia severa, podendo esta progredir para câncer invasivo (carcinoma *in situ*) (Woodman *et al.* 2007). Citologicamente, NIC I corresponde a lesão epitelial escamosa de baixo grau (*LSIL*) e NIC II e NIC III a lesão epitelial escamosa de alto grau (*HSIL*) (Figura 1). Existe a possibilidade de encontrar também células escamosas atípicas de significado indeterminado (*ASC-US*), e células escamosas atípicas *HSIL* (*ASC-H*) quando não é possível diagnosticar NICII e NICIII. A progressão ou a regressão das lesões é possível, para isto é necessário um diagnóstico precoce e exato (Steenbergen *et al.*, 2005).

Figura 1: Progressão do câncer cervical pelo Papilomavírus Humano (HPV). Por meio das microlesões, o vírus tem acesso às células da camada basal do epitélio cervical. Nas camadas superiores do epitélio ocorre a replicação do genoma viral e formação de novas partículas virais que são liberadas podendo iniciar uma nova infecção e, posteriormente poderá ocorrer a progressão para o câncer invasivo.



Fonte: Autor.

A triagem é importante para reduzir a incidência do câncer cervical, o teste de rastreamento mais comum é a colpocitologia, também conhecido como exame Papanicolaou ou preventivo. Através dele pode ser identificado as lesões pré-neoplásicas e o diagnóstico precoce pode evitar a progressão para o câncer invasivo (Peirson *et al.*, 2013).

A infecção pelo HPV é o principal fator para o desenvolvimento do câncer cervical, porém em alguns casos, o próprio sistema imune consegue combater a infecção, ocasionando alterações citológicas e histológicas transitórias ou assintomáticas (Bosch *et al.*, 2002).

O HPV está associado com aproximadamente 99,7% dos tumores do colo do útero (Munoz *et al.*, 2006). Entretanto, a presença de um HPV de alto risco não é suficiente para imortalizar as células epiteliais do hospedeiro. As alterações genéticas e epigenéticas são necessárias para o desenvolvimento da carcinogênese. Esses fatores podem alterar o ciclo celular, fazendo com que a célula hospedeira adquira uma característica maligna e invasiva (Szalmas *et al.*, 2009; Saavedra *et al.*, 2012).

Alguns cofatores ambientais podem influenciar o desenvolvimento do câncer, entre eles, o tabagismo, atuante no decréscimo da resposta imune e aumento nos

danos genéticos (Trimble *et al.*, 2005; Maclaughlan *et al.*, 2011; Moktar *et al.*, 2011; Ward *et al.*, 2011). O uso de contraceptivos orais também pode está relacionado, pois pode promover o aumento da expressão de oncogenes virais (Efird *et al.*, 2011; Ghanem *et al.*, 2011; Amaral *et al.*, 2014). Multiparidade decorrentes de mudanças hormonais induzidas pela gestação podem modular a resposta imune ao HPV (Bosch *et al.*, 2002). O sistema imune do hospedeiro também pode ser considerado como um cofator para o desenvolvimento do câncer cervical (Apple *et al.*, 1994; Maciag *et al.*, 2002).

2.2 ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL

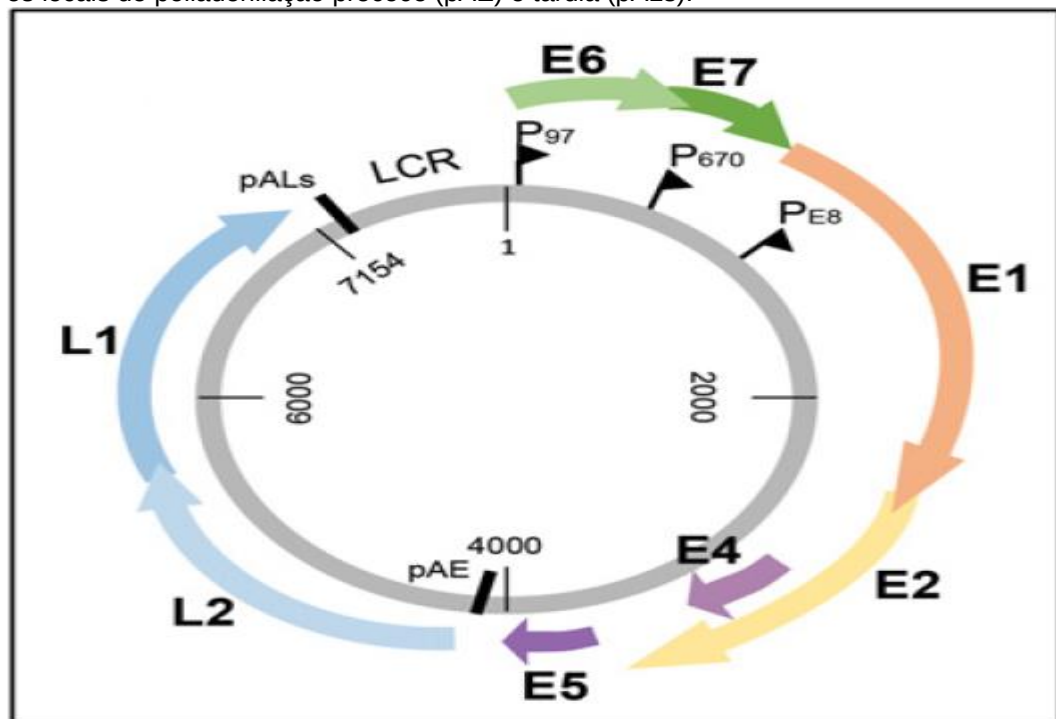
Os papilomavírus são um grupo de vírus pequenos que têm a capacidade de infectar mamíferos, reptéis e aves (Doorbar, 2005; Scheurer *et al.*, 2005). Possui um capsídeo proteico de configuração icosaédrica. Não existe envelope protegendo a partícula viral e seu interior é constituído por um genoma dupla-fita de ácido desoxirribonucleico (DNA) com cerca de 6.800 a 8.000 pares de bases (pb) em formato circular associado a histonas celulares (Tan *et al.*, 1998). O genoma dos papilomavírus pode conter entre 8 a 10 *open reading frames* (ORFs), estas sequências são expressas levando em consideração o padrão precoce e tardio da diferenciação da célula hospedeira ao longo da infecção (Graham, 2010).

A partícula do vírus do HPV segue as mesmas características morfológicas dos demais papilomavírus, apenas com algumas diferenças. O tamanho do genoma do HPV é cerca de 7.8Kb como mostra o esquema apresentado na Figura 2, destacando suas principais regiões. O genoma viral do HPV é constituída por aproximadamente oito ORFs, possuindo no mínimo seis genes de expressão precoce e dois genes que se expressam tardiamente. Eles são denominados respectivamente de E (*Early*) e L (*Late*) (Zur Hausen, 2000; Fehrman, 2003).

A região E é constituída pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7. Estes genes são expressos logo após a infecção quando ocorre a indução e a síntese de DNA. O gene E1 está relacionado com a replicação do DNA viral, E2 com o controle da transcrição e replicação, E4 manutenção do vírus e alteração da matriz intracelular, E5, E6 e E7 estão envolvidos com a proliferação e transformação celular (Kisseljov, 2000; Burd, 2003; Silva, 2003). A região L é formada pelos genes L1 e L2, os quais

codificam as proteínas do capsídeo viral (Lin *et al.*, 2002; Burd, 2003; Fehrmann & Laimins, 2003), sendo assim, estas são expressas em estágios posteriores (zur Hausen, 1996), diferentemente das proteínas E que são expressas logo após a infecção quando ocorre a indução e a regulação da síntese de DNA. A região reguladora LCR (*Long Control Region*) ou URR (*Upstream Regulatory Region*) varia de 400 a 1000 pares de bases, localizadas entre as regiões L1 e E6. Nessa região, existem sequências estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além da sequência de origem de replicação (Kisseljov, 2000; Burd, 2003). É uma região em que variações podem influenciar a progressão do câncer cervical e resultar na perda da capacidade de ligação dos fatores transcricionais E2, YY1, NF-1, AP1.

Figura 2: Representação esquemática do genoma do HPV evidenciando os genes de expressão precoce (E), tardia (L), região regulatória (LCR), os promotores (P₉₇, P₆₇₀, P_{E8}) e os locais de poliadenilação precoce (pAE) e tardia (pALs).



Fonte: Modificado de Graham, 2017.

2.3 CLASSIFICAÇÃO DOS PAPILOMAVÍRUS

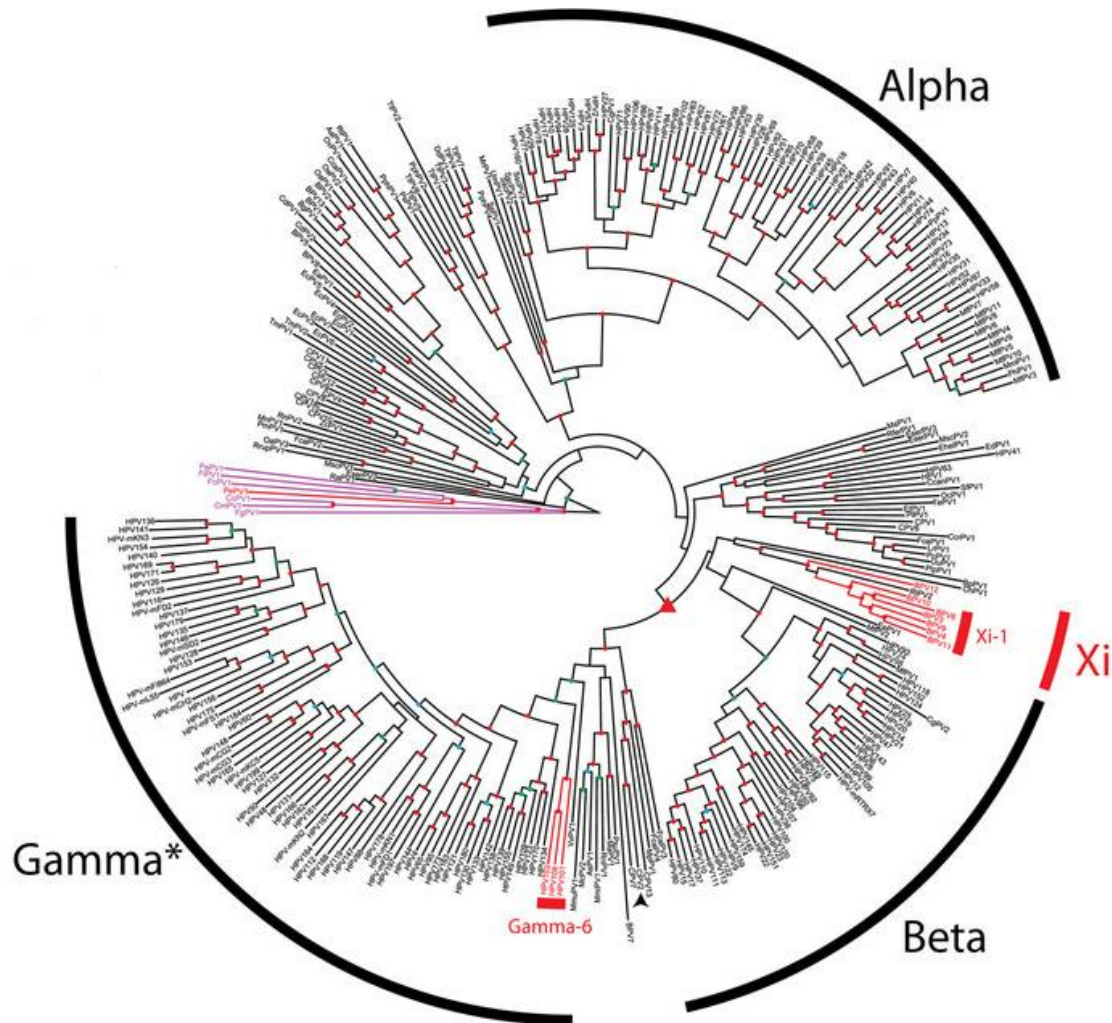
Os papilomavírus (PVs) pertencem à família *Papillomaviridae* e possuem a capacidade de infectar não apenas humanos, mas também outros mamíferos, aves,

repteis, sendo esses denominados com base no nome do hospedeiro a partir do qual o genoma PV foi isolado. BPV (*Bovine Papillomavirus*) infectam bovinos, CRPV (*Cottontail Rabbit Papillomavirus*) infectam coelhos, COPV (*Canine Oral Papillomavirus*) cães e HPV (*Human Papillomavirus*) infectam humanos (Scheurer et al., 2005; Bernard HU et al., 2010).

A nomenclatura dos papilomavírus foi estabelecida pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (*International Committee on Taxonomy of Viruses*, ICTV). A classificação é de acordo com a sequência nucleotídica do gene L1, tornando-se possível o agrupamento dos PVs em gênero (quando se tem sequências acima de 60% de homologia), em espécies (quando apresentam homologia entre 71-89%) e cepas quando diferem em 10% na sequência de L1 (de Villiers et al., 2005; Kalantari et al., 2010). A classificação dos HPVs baseado no gene L1 agrupa de forma coerente os tipos de HPVs em gênero e espécies. Porém, a análise de um único gene não é suficiente para classificar as variantes, por isso para nomear uma variante é necessário o estudo do genoma completo. Uma sequência é agrupada em variante quando difere 1%-10% em relação à sequência de referência e para ser considerada uma sublinhagem deve variar entre 0,5% a 1% (Burk et al., 2013; Zigu et al., 2015).

Os HPVs são divididos em cinco gêneros (Figura 3): *Alphapapillomavirus* (Alfa), *Betapapillomavirus* (Beta), *Gammapapillomavirus* (Gama), *Mupapillomavirus* (Mu) e *Nupapillomavirus* (Nu) (Bernard et al., 2010; de Villiers et al., 2004). Os dois principais gêneros de HPV são os gêneros Alfa e Beta, com aproximadamente 90% dos tipos virais membros de um desses dois gêneros (Muñoz et al., 2006).

Figura 3: Árvore filogenética da família *Papillomaviridae*. (*) Indica que alguns membros do clado ainda não foram reconhecidos como *Gammapapillomavirus*.



Fonte: Van Doorslaer, 2016.

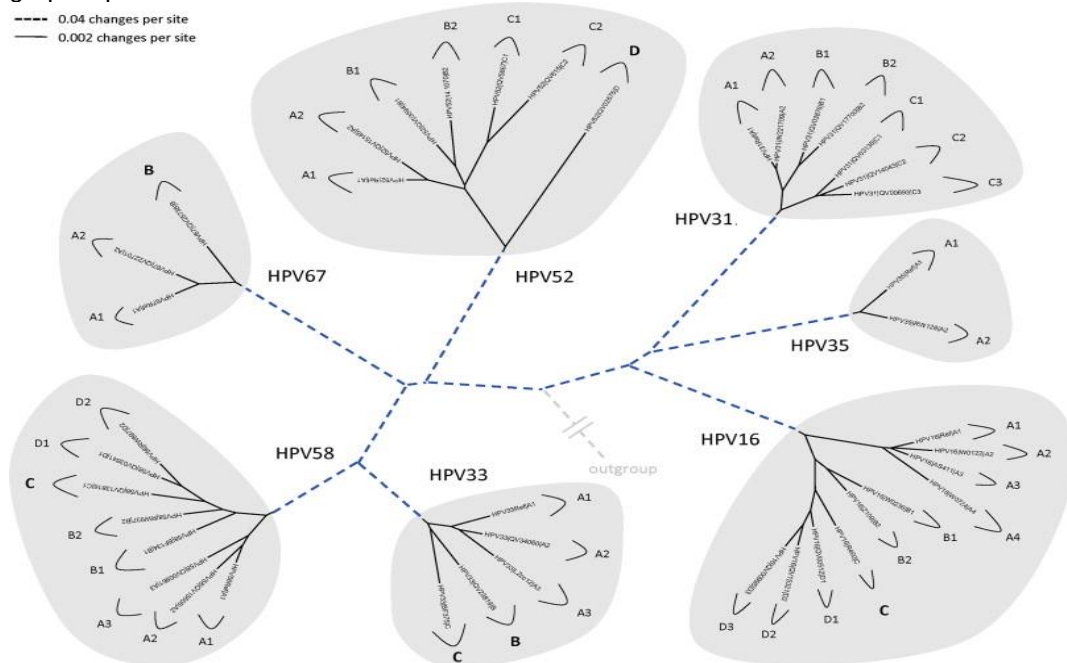
Mais de 200 tipos de HPV têm sido identificados (Bernard *et al.*, 2010) e cerca de 40 tipos acometem o trato genital sendo classificados em alto risco (HR-HPV) e baixo risco (LR-HPV), refletindo o seu potencial oncogênico (Doorbar, 2006; zur Hausen, 2002). Os HPVs de alto risco estão associados às lesões encontradas na vagina, vulva, pênis e colo do útero e incluem os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 (Badaracco *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2003; Gurgel *et al.*, 2013; Stevens, 2002). Os HPVs de baixo risco são tipicamente implicados ao surgimento de verrugas genitais e incluem os tipos 6, 11, 42, 44, 53, 83 (zur Hausen, 2002; Li *et al.*, 2012; Gurgel *et al.*, 2013).

De acordo com o potencial para desenvolvimento de câncer na região genital os Alpha-Papilomavírus são divididos em altamente carcinogênico HPV-16, 18, 31,

33, 45, 51 e 52; provavelmente carcinogênico HPV-68; possivelmente carcinogênico HPVs 26, 53, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 73, 82. Além disso, outros membros estão frequentemente associados a lesões benignas na região genital e não genital, tais como o HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 e 89 (Schiffman *et al.*, 2009; Cubie, 2013).

A distribuição dos genótipos dos HPVs anteriormente era classificada de acordo com as áreas geográficas e as populações estudadas (Bosch *et al.*, 1995; Walboomers *et al.*, 1999; Clifford *et al.*, 2005). Entretanto, esse conceito foi revisto e passou-se a agrupar os HPVs em variantes e subvariantes. O HPV-31 foi reagrupado em três variantes (A, B e C) e sete subvariantes, as variantes A e B são consideradas mais oncogênicas quando comparadas com a variante C (Figura 4) (Burk *et al.*, 2013). Os HPVs do gênero Beta são mais frequentemente relacionados a infecções cutâneas. Os demais tipos de HPV estão distribuídos entre os gêneros, Gama, Mu e Nu, e estão correlacionados a papilomas cutâneos e verrugas sem progressão maligna (de Villiers *et al.*, 2004).

Figura 4: Árvore filogenética mostrando os tipos representativos com variantes e subvariantes no grupo alpha-9.



Fonte: Burk *et al.*, 2013.

A distribuição dos genótipos do HPV varia entre áreas geográficas (Bosch *et al.*, 1995; Walboomers *et al.*, 1999; Clifford *et al.*, 2005). Vários estudos, realizados em relação à distribuição mundial dos tipos de HPV, demonstraram que o HPV-16 é

o tipo mais comum seguido pelo HPV-18 na Europa, América Central e América do Sul, pelos HPVs 33, 52, 56 e 58 na Ásia, pelo HPV-53 na América do Norte e pelo HPV-31 na Europa (Bosch *et al.*, 1995; Clifford *et al.*, 2003; Clifford *et al.*, 2005; de Sanjosé *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2009). Estudos realizados em amostras de mulheres com lesão cervical em Recife (PE) evidenciaram que o HPV-16 é o tipo mais frequente detectado, seguido pelos tipos HPV-31, HPV-33, HPV-58, e em menor frequência o HPV-18 (Lorenzato *et al.*, 2000). Baldez da Silva *et al.* (2009) corroboraram os achados de Lorenzato *et al.* (2000) confirmando que na população de Recife o HPV-31 possui uma alta incidência (15,49%) quando comparado com o HPV-18 (2,82%) e o HPV-33 (2,82%). É notável que diferenças na distribuição dos HPVs podem ocorrer devido ao processo de migração de pessoas, o que contribui para uma maior diversidade populacional, e comportamentos sexuais (Bosch *et al.*, 1995; Barzon *et al.*, 2008).

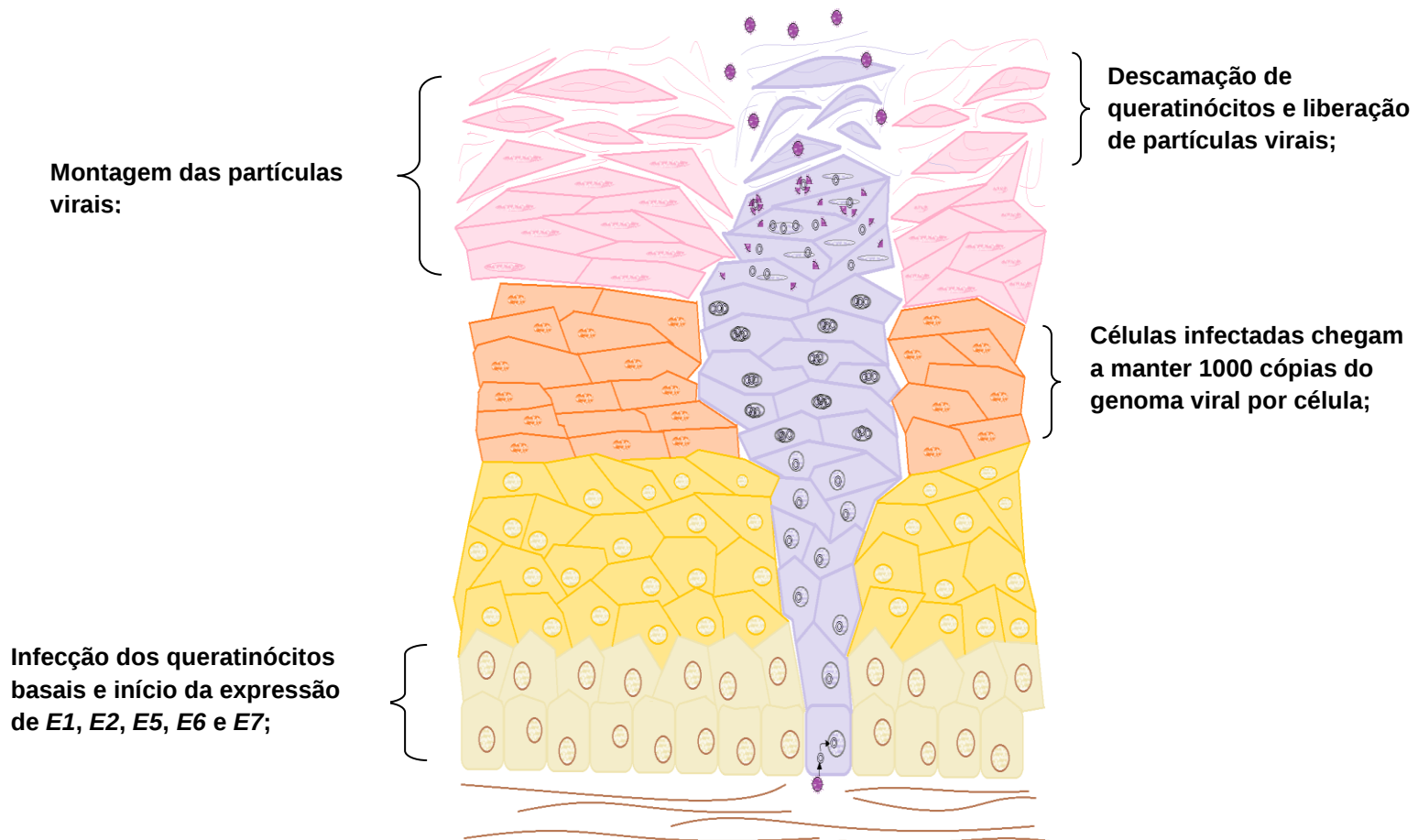
2.4 INFECÇÃO PELO HPV

O ciclo do vírus está relacionado com a diferenciação das células hospedeiras do HPV que são os queratinócitos (Stubenrauch e Laimins, 1999; zur Hausen 2002). Acredita-se que a entrada do HPV nas células basais, exposta em micro lesões ou abrasões no epitélio cervical, é mediado por proteoglicanos de heparan sulfato (HSPGs) e outros componentes da membrana basal da mucosa anogenital, a exemplo da laminina que atuam como receptores primários para ancoragem do vírus através da interação com a proteína L1 do HPV (Combata *et al.*, 2001; Giroglou *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2009; Doorbar *et al.*, 2012). Em seguida, alterações conformacionais irão resultar na exposição da região amino terminal da proteína L2, permitindo a ação da furina convertase que cliva uma região de L2, resultando em uma segunda alteração conformacional, expondo o sítio de ligação para um segundo co-receptor. É sugerido que esse segundo receptor seja a alfa integrina 6. Também é possível encontrar a ação de fatores de crescimento na internalização do vírus e na transferência do genoma para o núcleo da célula (Evander *et al.*, 1997; Licitra *et al.*, 2006; Scheurer *et al.*, 2007; Kines *et al.*, 2009; Surviladze *et al.*, 2013).

O processo seguinte após a entrada do vírus na célula é a acidificação das vesículas de endocitose, levando a desencapsidação do genoma viral e migração para o núcleo da célula, este será estabilizado na forma de epissomas. Assim, inicia-

se o ciclo de replicação viral, com a expressão dos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7 (Combata *et al.*, 2001; Giroglou *et al.*, 2001; Woodman *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2009; Sapp e Day, 2009; Doorbar *et al.*, 2012) (Figura 5).

Figura 5: Esquema do ciclo infeccioso a partir da infecção pelo HPV.



Fonte: Cordeiro, 2015.

Com a entrada do HPV na célula hospedeira, as proteínas E1 e E2 medeiam a replicação do genoma viral em baixos níveis. Quando as células da camada basal passam pelo processo de divisão celular, algumas células filhas movem-se para o estrato superior das camadas da mucosa, iniciando o processo de diferenciação celular (Fehrmann e Laimins, 2003; McCance, 2005; Freitas *et al.*, 2012). Nesta fase, o genoma viral inicia a transcrição dos genes da fase tardia do ciclo de infecção (L1 e L2) os quais estão aptos a iniciar uma nova infecção. A proteína E2 do HPV é importante nesse estágio, pois ela participa da regulação de dois

promotores no genoma viral, o promotor dependente de diferenciação p670 (localizado no gene E7) o p97 (localizado na região 3' da LCR) que é o responsável pela expressão dos genes da fase inicial e também permite a expressão dos genes da fase tardia do vírus incluindo o E4 (facilitando o rompimento do citoesqueleto citoplasmático para a liberação dos vírions) (Doorbar *et al.*, 1991) e dos genes L1 e L2 (codificam os genes para o capsídeo viral). Alternativamente, o sinal de poliadenilação precoce (pAE) bloqueia a expressão dos genes da fase tardia durante o início do processo de infecção, inibindo a expressão prematura de moléculas imunogênicas e assegurando a persistência da infecção viral. Por fim, as partículas virais são liberadas com ajuda da proteína E4, que desmancha a rede de citoqueratina e permite a liberação dos vírus (Bernard, 2013; Doorbar, 2013; McBride, 2013).

2.5 REGIÃO LONGA DE CONTROLE (LCR) E OS FATORES DE TRANSCRIÇÃO

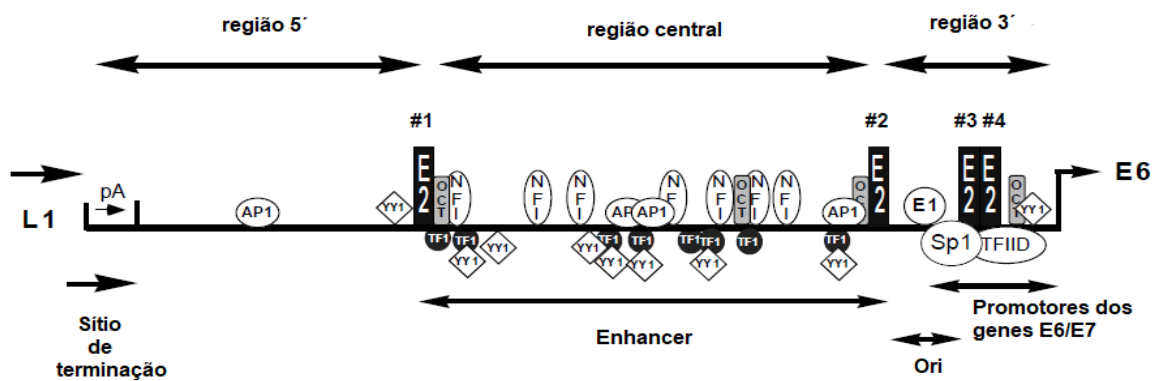
O genoma do HPV é dotado de uma região reguladora LCR que pode variar entre 400-1000 pb, localizado entre os genes L1 e E6. Didaticamente, a LCR é dividida em três segmentos: região 5', o segmento central e a região 3' (O'Connor, 1995; Bernard, 1995; Bernard, 2013).

A região 5' da LCR contém um sítio de terminação AATAAA da síntese dos genes L1 e L2, localizados 100pb *downstream* o término do gene L1. Nesta região, existem sítios de ligação para alguns fatores transcricionais, tais como E2, proteína ativadora 1 (AP1) e Fator yin-yang (YY1) (Bernard, 2013).

A região 3' da LCR é constituída pelos promotores para a transcrição dos genes da fase precoce (E6 e E7) e a região TATAAA box, localizados de 21 a 26pb *upstream* E6, onde se liga a RNA Polimerase II. A região 3' também possui uma segunda região TATA box, que está localizada de 32 a 37pb *upstream* E6 e é o sítio de ligação dos fatores transcricional E2, que reprime a transcrição, e do fator transcricional Promotor Seletivo 1 (Selective promoter 1, SP1), que ativa a transcrição. Assim, SP1 e E2 competem pelo sítio de ligação, regulando a síntese do DNA viral. Outro fator transcricional celular denominado YY1 também atua na região 3' da LCR, se ligando próximo ao promotor p97 e, assim, diminuindo a expressão dos oncogenes E6 e E7.

A região central da LCR contém os *enhancers* epitélio-específicos, por este motivo que este grupo de vírus dificilmente infecta outros tipos celulares. Esta região contém diversos sítios de ligação para vários fatores transcricionais celulares que modulam a expressão dos genes virais, tais como: AP-1, Fator nuclear 1 (Nuclear Factor 1, NF-1), Fator de ligação à octâmeros 1 (Octamer Binding Factor 1, Oct-1), o YY1 e o C/EBP beta (Bernard, 2013) (Figura 6).

Figura 6. Representação esquemática da LCR. A figura mostra os segmentos 5', região central e o segmento 3' da LCR.



Fonte: adaptado de O'CONNOR, 1995.

A proteína E2 ou suas isoformas competem com a ligação dos fatores transcricionais celulares em determinados sítios da LCR, reprimindo ou ativando a expressão dos genes precoce do genoma viral. A proteína E2 também regula a expressão de genes humanos, nomeadamente os genes que codificam para as metaloproteínases (MMP9), interleucinas (IL-10), beta-4 integrinas e telomerase reversa humana (hTERT). Mutações ou integração do genoma viral no genoma do hospedeiro podem causar a diminuição ou parada da expressão do gene E2 e, como consequência, a diminuição da sua atividade repressora, resultando no aumento da expressão dos oncogenes E6 e E7. A proteína E2 também atua na segregação, empacotamento e manutenção do genoma viral; na interação com outras proteínas virais, tais como E1, E1[^]E4 e E7; e atua também como um carcinógeno (Mcbride, 2013).

O fator AP-1 modula a expressão do gene viral e contribui para a ativação epitelial específica, esse fator está presente em todas as LCR dos HPVs que infectam a região genital possuindo no mínimo um sítio de ligação, sendo a maioria constituída por 3 a 4 sítios. Outra função dos sítios para ligação desse fator é que eles podem traduzir sinais mitogênicos aumentados resultante da ação do gene E5, em níveis elevados de transcrição do gene viral (Leechanachai et al., 1992).

O Oct-1 regula um grande número de genes virais e celulares. Foi observado que a superexpressão desse fator resulta em uma diminuição da atividade do *enhancer* do HPV, porém em níveis fisiológicos presentes nas células epiteliais o Oct-1 ativa o *enhancer* (O'Connor M, 1995).

O fator YY1 desempenha um papel na redução da regulação da expressão gênica em vários vírus, incluindo o HPV. Ele pode ajudar a manter níveis baixos do vírus facilitando infecções de longo prazo, porém, havendo alterações nos locais de ligação para esse fator, os níveis de expressão dos genes do HPV podem aumentar, consequentemente contribuindo para a tumorigênese (Dong et al, 1994).

As alterações nucleotídicas na LCR do HPV-31 G7449A, G7457A, C7474T, G7525A T7575C estão inseridas em regiões de ligação para os fatores de transcrição, podem afetar a expressão de oncogenes E6 e E7 (Cento et al., 2011). Essas variações podem influenciar a progressão do câncer cervical e resultar na perda da capacidade de ligação dos fatores transcricionais E2, YY1, NF-1, AP1. De forma geral, existem poucos estudos sobre a relevância clínica da heterogeneidade genética do HPV-31 (Schiffman et al., 2010; Xi et al., 2012; Chagas et al., 2011, 2013). No entanto, dois estudos demonstraram que as variantes A e B do HPV31 estão estatisticamente associadas com risco para HSIL (Schiffman et al., 2010; Xi et al., 2012).

Na literatura está bem estabelecido que o HPV-16 é o mais prevalente na população brasileira e também a nível global (Cruz et al., 2004; Alencar et al., 2006; Fernandes et al., 2008; De Sanjose et al., 2010; Fernandes et al., 2010; Castro et al., 2011; Jemal et al., 2013; Gurgel et al., 2013). Porém, foi escolhido trabalhar com o HPV-31, pois existem poucos trabalhos relacionados com análise funcional de polimorfismos e ele é o segundo tipo mais prevalente na região Nordeste do Brasil

(Baldez da Silva *et al.*, 2009, 2012; Chagas *et al.*, 2011, 2013, 2015; Gurgel *et al.*, 2015) assim como é observado no sul da Europa (Cento *et al.*, 2011). As diferenças na prevalência dos tipos de HPVs ocorrem devido aos aspectos relacionados com a migração de pessoas, interferindo na diversidade populacional (Bosch *et al.*, 1995; Barzon *et al.*, 2008).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do trabalho foi realizar um estudo funcional das variantes nucleotídicas presentes na região promotora (LCR) do HPV-31 no estado de Pernambuco, e dessa forma auxiliar a compreensão de fatores que possam contribuir para o desenvolvimento do câncer cervical.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar os efeitos de diferentes concentrações do fator transcricional E2 na ativação ou repressão da LCR do HPV-31;
- ✓ Avaliar a expressão gênica mediada por LCR variantes do HPV-31.

4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco, número CAAE: 03606212.7.0000.5208. Todas as pacientes participantes do estudo, provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de PE, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

O registro do CQB da Fiocruz-Ageu Magalhães, onde parte do projeto foi desenvolvido é 0098/99.

4.1 VARIAÇÕES NUCLEOTÍDICAS ESTUDADAS

Os polimorfismos estudados para LCR do HPV-31 foram identificados pelo nosso grupo de pesquisa no trabalho já publicado *Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16, HPV31, and HPV58 found in North-East Brazil*" (<http://dx.doi.org/10.1155/2015/130828>).

A tabela 1 mostra todas as variações nucleotídicas presentes na LCR nos três isolados (89, 21 e 66) escolhidos para este trabalho. O isolado 66 apresentou apenas uma deleção de CTACTTGTTTC localizado na posição: 7330 – 7339. No isolado 89, observou-se alterações nos locais de ligação para fatores de transcrição, como o YY1, APP1, NF1 e em dois sítios para o regulador transcricional E2, além de uma deleção de GTTCCTGCT na posição: 7335 – 7344. O isolado 21 apresentou a mesma deleção do isolado 89 e polimorfismos nos locais de ligação para fatores de transcrição, como o YY1, APP1, NF1 e em três sítios para o regulador transcricional E2.

Tabela 1. Variabilidade genética da LCR dos isolados de HPV-31. Os nucleotídeos conservados em relação à sequência de referência (J04353.1) estão marcados com pontos. Referência: sequência protótipo do HPV-31.

LCR-31																
	7151	*	*	7354	7383	7384	7394	7449	7457	7474	7533	7572	7575	7642	7659	7860
Referência (J04353)	A	*	*	A	A	G	C	G	G	C	T	C	T	C	T	G
Isolado 89	G	.	Del	G	C	A	A	A	A	T	C	T	C	A	G	.
Isolado 21	G	.	Del	.	C	A	A	A	A	T	C	.	C	A	.	A
Isolado 66	.	Del	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Fator transcricional	YY1	-		AP- 1	YY1	YY1	YY1/NF- 1	Próximo a YY1	Próximo a YY1	E2	Próximo a E2	NF- 1	NF- 1	AP- 1	AP- 1	Próximo a E2

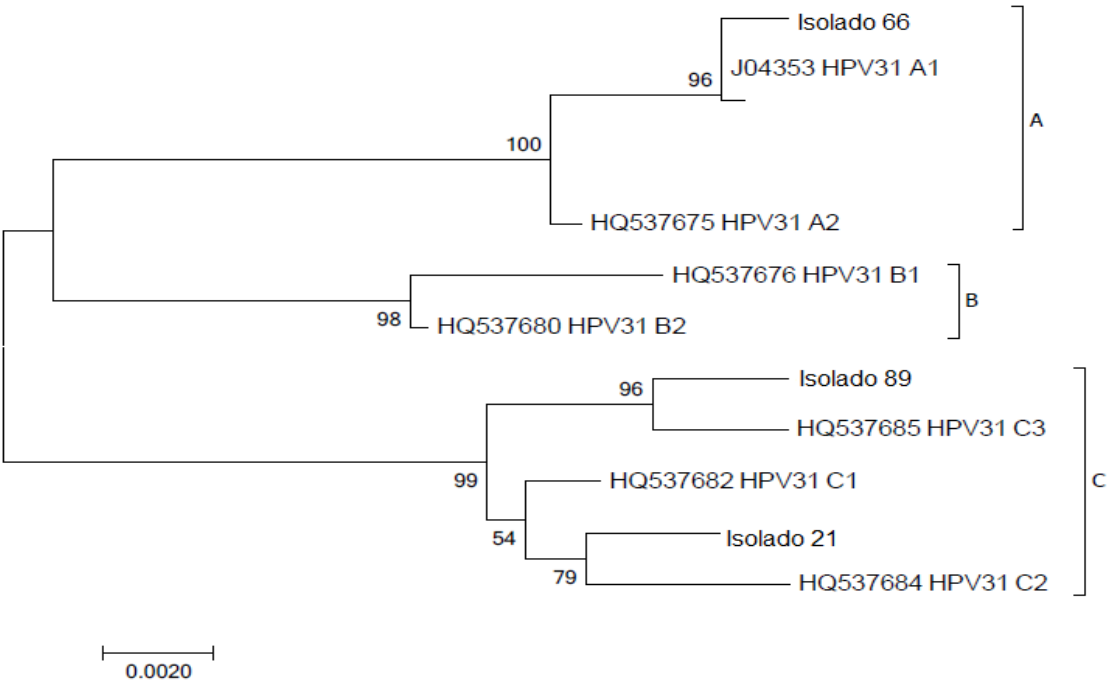
* Deleção de GTTCCTGCT (posição: 7335 – 7344)

* Deleção de CTACTTG TTC (posição: 7330 – 7339)

Fonte: Gurgel,2015

A construção da árvore filogenética (Figura 7), mostrou que o isolado 66 pertence a linhagem A e que os isolados 21 e 89 pertencem a linhagem C.

Figura 7: Árvore filogenética de variantes do HPV-31 com base na região reguladora LCR (*Long Control Region*).



4.2 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES LCR VARIANTES E PROTÓTIPO

Inicialmente, os três isolados positivos para o HPV-31 contendo as variantes moleculares e o protótipo (LCR do HPV-31 sem nenhum polimorfismo) foram amplificadas por PCR.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µL, contendo 5 µL do material genômico obtido (100 ng/µl), 2 mM de MgSO₄ (Invitrogen), 0,2 mM de dNTP mix (Promega), 10 pmoles de cada *primer* e 1U de Platinum *Taq* DNA polimerase *High Fidelity* (Invitrogen). As reações foram submetidas a 94°C por 5 minutos, com 35 ciclos de amplificação (94°C por 1 minuto; 53,5°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto e 30 segundos), seguidos ao final por 5 minutos a 72°C. Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 2.

Todas as amostras foram amplificadas na presença de controles negativos (todos os componentes da reação sem o material genômico, em substituição é utilizado água milli-Q). Os produtos da PCR obtidos foram analisados em gel de agarose 1.5% corados com brometo de etídio para verificação da qualidade do DNA.

Tabela 2. *Primers* usados na amplificação das regiões LCR variantes do HPV- 31.

Primers	Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3')	Amplicon	Temperatura de anelamento
LCR HPV-31	F: *CTCGAGGTTTTCTGCAGATTTAG R: **AAGCTTGTTAAATCTGTAAATGC	846	53,5°C

*Verde: Sítio de restrição para enzima XhoI.

**Azul: Sítio de restrição para enzima HindIII.

4.3 CLONAGEM DOS PRODUTOS DE PCR

Após a amplificação, as amostras foram purificadas utilizando-se o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de ligação dos produtos de PCR no plasmídeo pGEM-T easy (Promega) foram realizadas seguindo as instruções do fabricante.

Os plasmídeos foram utilizados para transformar bactérias *Escherichia coli* da linhagem DH5 α . Inicialmente, 10 μ L da solução de ligação contendo os plasmídeos foram misturados com 50 μ L das células quimiocompetentes, depois de homogeneizada a solução foi mantida no gelo por 15 minutos. Em seguida, as células foram submetidas a um choque térmico por 5 minutos a 42°C. Imediatamente após o choque, foi adicionado 1 ml de meio líquido LB (Luria-Bertani) e em seguida as células foram incubadas a 37°C por 1 hora em agitação. Após a incubação, foi semeado 200 μ L em placas de petri contendo meio LB sólido com ampicilina (100 μ g /ml).

As placas de petri foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C. As colônias que cresceram foram isoladas e repicadas, sendo incubadas *overnight* a 37°C. Os repiques foram colocados na estufa *overnight* a 37°C sob agitação em meio LB líquido contendo ampicilina por 16 horas. O DNA plasmidial foi extraído, para confirmar inicialmente a presença de clones, utilizando-se o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

4.4 REAÇÃO DE DIGESTÃO DO DNA PLASMIDIAL

Cada produto da extração de DNA plasmidial foi digerido em uma reação de volume final de 20 μ l, contendo 1U da enzima XhoI e 1U da enzima HindIII e um tampão que permite a dupla digestão com essas duas enzimas. A reação foi incubada por no mínimo 4 horas a 37°C.

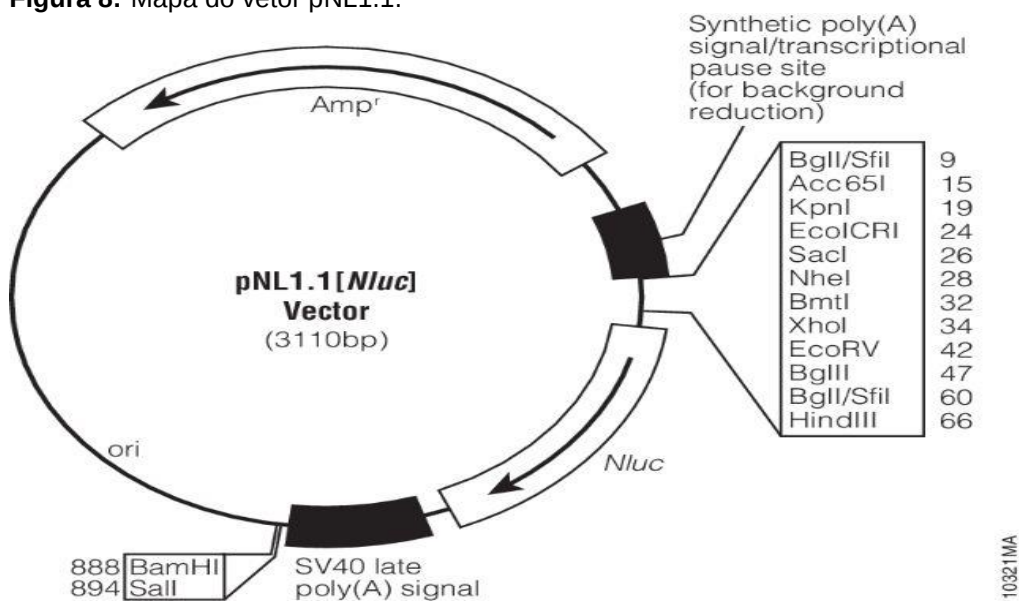
4.5 SUBCLONAGEM DAS VARIANTES DA REGIÃO LCR E PROTÓTIPO

Todos os clones confirmados por digestão enzimática para liberação do inserto (sequências variantes e protótipos) foram subclonados no plasmídeo pNL1.1 (Nluc) (Promega) (Figura 8), de modo que o gene-repórter (*Nluc*, luciferase) se torne dirigido pela sequência da região promotora LCR do HPV-31. O gene E2 do HPV-31, regulador transcricional intrínseco do vírus, foi subclonado no vetor de expressão pCI-neo. A liberação do inserto foi realizada por digestão dupla através das enzimas XhoI (Temperatura ótima 37°C, Promega) e HindIII (Temperatura ótima 37°C, Promega). Os produtos de digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1.5%. Em

seguida, foi realizada a purificação dos produtos da digestão através do kit *Wizard SV gel and PCR Clean-Up System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante.

Posteriormente, foram realizadas reações de ligação entre o plasmídeo pNL1.1 (Nluc) e o inserto (sequências variantes e protótipos); e o plasmídeo pCI-neo com a sequência do E2 dos clones recombinantes. O produto dessas novas ligações foi usado como agente transformante de células de *E. coli*.

Figura 8: Mapa do vetor pNL1.1.



4.6 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS *E. COLI*

Células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH5α foram transformadas com as construções contendo as sequências variantes de LCR do HPV-31 e protótipo, e selecionadas após 16 horas de crescimento a 37°C em meio LB na presença do antibiótico ampicilina (100 µg /ml). As colônias que cresceram foram isoladas e repicadas, sendo incubadas *overnight* a 37°C. Os clones recombinantes foram selecionados e colocados na estufa *overnight* a 37°C sob agitação em meio LB líquido contendo ampicilina (100 µg /ml) por 16 horas. O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo as instruções do fabricante e por fim digerido.

4.7 SEQUENCIAMENTO DE DNA E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS OBTIDAS

Para confirmação dos clones, o DNA plasmidial dos recombinantes foi submetido ao sequenciamento automático pelo método dideoxi-terminal fluorescente, utilizando o kit *BigDye™ Terminator Cycle Sequencing v 3.1* (Applied Biosystems®), através da Plataforma Tecnológica de Sequenciamento do Laboratório de Genômica e Expressão Gênica –LABCEN/CB/UFPE, utilizando o sequenciador automático de DNA Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystem®), de acordo com os padrões estabelecidos nesta unidade. Foram utilizados iniciadores específicos, que anelam na sequência do vetor e no inserto com a finalidade de confirmações dos clones recombinantes. Cada clone obtido foi sequenciado três vezes em cada sentido (direto e reverso).

As sequências obtidas foram submetidas ao pacote de programas *Staden*, com os programas *Pregap4* e *Gap4* (*Staden et al.*, 1996) para retirada da sequência do vetor, formação dos *contigs* e análise da qualidade do cromatograma. A identidade das sequências foi determinada usando o BLAST, disponível no site www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST.

4.8 ISOLAMENTO DO DNA DOS VETORES RECOMBINANTES EM LARGA ESCALA (MAXI-PREPARAÇÃO)

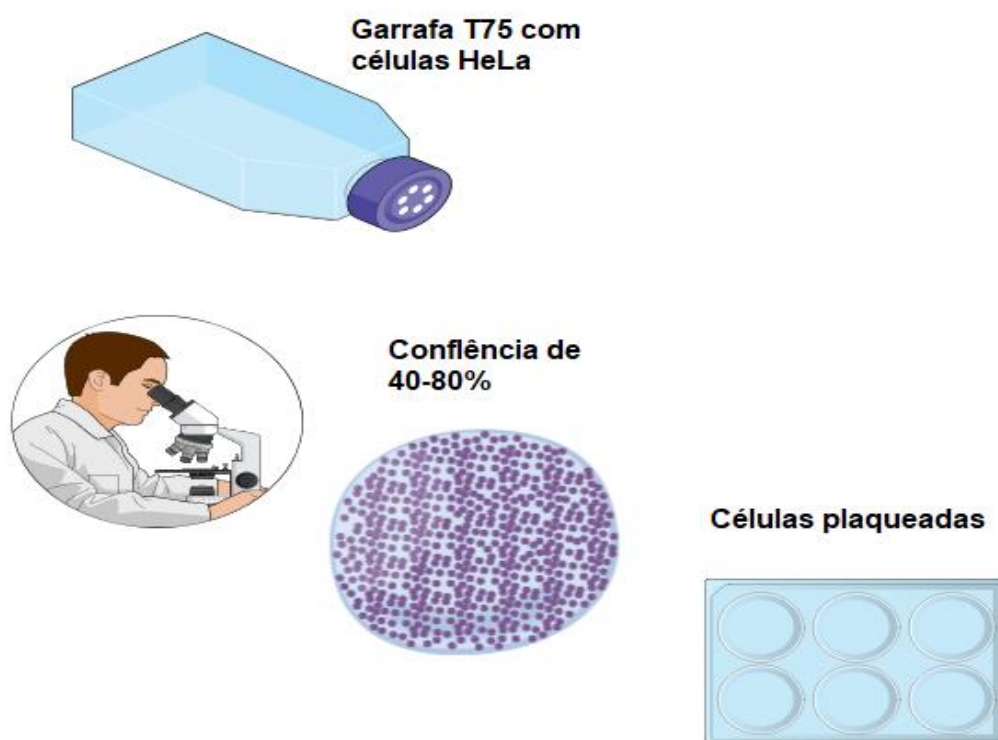
Após a confirmação dos resultados por sequenciamento, o DNA dos vetores recombinantes contendo as sequências variantes da LCR HPV-31, o protótipo e o regulador transcricional E2 foram isolados por maxi-preparação utilizando-se o *kit Plasmid Plus Maxi* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos da maxi-preparação foram quantificados e posteriormente utilizados nos ensaios de transfecção.

4.9 CULTIVO E TRANSFEÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Células eucarióticas HeLa (Queratinócitos derivados de adenocarcinoma de colo uterino) foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM-Invitrogen®) acrescido de 10% soro bovino fetal (Gibco®); 1% L-glutamina (Sigma®) – DMEM completo. As células foram mantidas em estufa úmida a 37°C e com 5% de CO₂. Quando as garrafas de cultura celular T75 estavam com uma confluência de

40-80%, foi realizada a contagem de células no Vicell e em seguidas distribuídas em placas de seis poços (Figura 9). Para o congelamento, aproximadamente 10^6 células foram congeladas em 1ml de meio de cultura acrescido de soro bovino fetal e dimetilsulfóxido 10% (DMSO, Sigma Aldrich).

Figura 9. Representação esquemática do processo que antecede a etapa da transfecção.

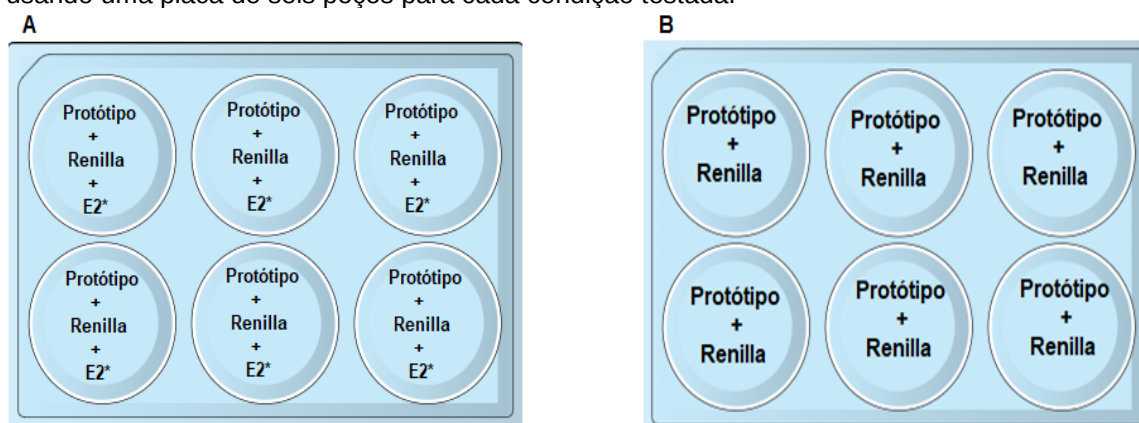


Fonte: autor

O experimento de transfecção foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa (Figura 10), as células foram transfectadas com o objetivo de determinar a concentração ideal do regulador transcricional E2 que melhor ativasse a LCR. As transfecções foram realizadas em placas de cultura de células de 6 poços, onde 4×10^5 células foram plaqueadas em 2ml de meio de cultura. Todos os grupos de células foram co-transfectadas com plasmídeo contendo o regulador transcricional E2 do HPV- 31 nas concentrações de 10 ng, 25ng, 50 ng, 100ng e 300ng; juntamente com um plasmídeo expressando Renilla luciferase (30 ng) como normalizador da luminescência e com 100 ng do protótipo e o controle foi realizado com o protótipo sem a presença do regulador transcricional E2. As células foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 48 horas. Posteriormente, os extratos celulares foram utilizados para realizar a dosagem de luminescência e em

seguida a lise celular utilizando o *ReporterLysis Buffer* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante para ser realizada a quantificação de proteínas.

Figura 10: Representação esquemática da primeira etapa da transfecção. **A:** Todos os seis poços foram co-transfectados com o protótipo, renilla e o regulador transcricional E2 do HPV- 31 nas concentrações de 10 ng, 25 ng, 50 ng, 100 ng e 300ng. **B:** A placa B representa o cotrole do experimento, realizado com a presença do protótipo e o plasmídeo expressando Renilla luciferase como normalizador da luminescência. Todas as condições dos experimentos A e B foram feitas usando uma placa de seis poços para cada condição testada.



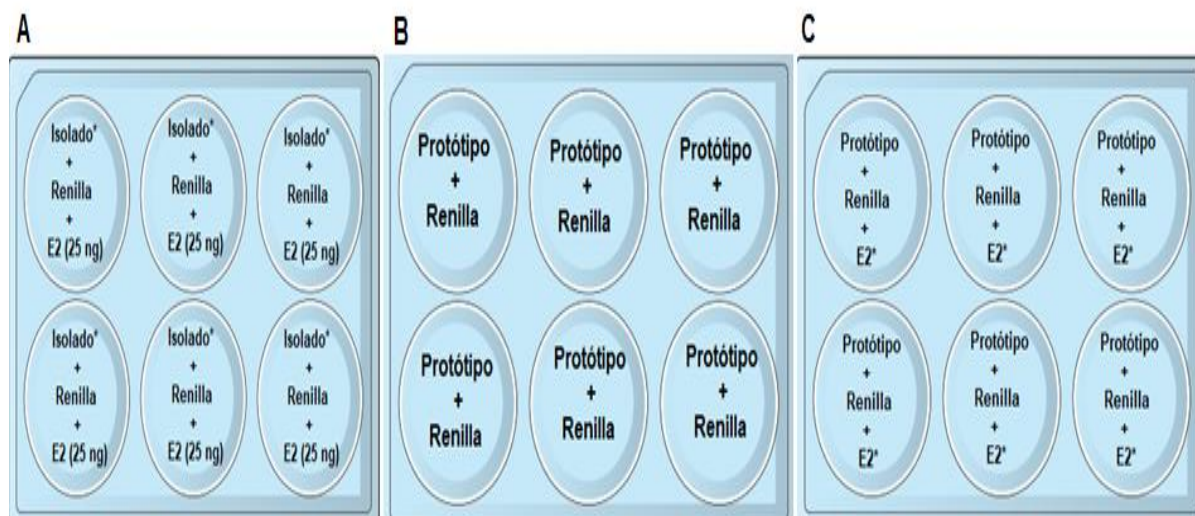
E2* → Representação das diferentes concentrações de E2 testadas, para condição foi usada uma placa de seis poços.

Fonte: autor

Com a concentração do regulador transcricional E2 definida, foi construído a segunda etapa dos experimentos (Figura 11). Todos os grupos de células foram co-transfectadas com plasmídeo contendo o regulador transcricional E2 do HPV-31 na concentração de 25 ng, juntamente com um plasmídeo expressando Renilla luciferase (30 ng) como normalizador da luminescência e com 100 ng das regiões LCR polimórficas e o protótipo como controle realizado com e sem a presença do E2. As células foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 48 horas. Posteriormente, os extratos celulares foram utilizados para realizar a dosagem de luminescência e em seguida a lise celular utilizando o *ReporterLysis Buffer* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante para ser realizada a quantificação de proteínas.

Figura 11: Representação esquemática da segunda etapa da transfecção. **A:** Todos os seis poços foram co-transfectados com os isolados (regiões LCR polimórficas) separadamente, juntamente com um plasmídeo expressando Renilla e o regulador transcricional E2 na concentração de 25 ng. **B:** Placa representando um dos controles com a presença do protótipo e um plasmídeo expressando

Renilla. **C:** O controle realizado com o protótipo, Renilla e E2. Todas as condições dos experimentos A, B e C foram feitas usando uma placa de seis poços para cada condição testada.



Isolado* → Cada LCR polimórfica foi transfectada separadamente, para condição foi usada uma placa de seis poços.

E2* → A concentração do E2 utilizado no controle foi de 25 ng.

Fonte: autor

4.10 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DIRIGIDA PELA LCR POLIMÓRFICA DOS HPV-31

O ensaio de luminescência foi realizado com o material do extrato celular usando o kit Nanoluc (Promega). As leituras foram realizadas no GloMax® 96 Microplate Luminometer w/Dual Injectors (Promega). Com a finalidade de garantir comparáveis eficiências da transfecção, os resultados foram normalizados por *renilla firefly* juntamente com a quantificação das proteínas.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

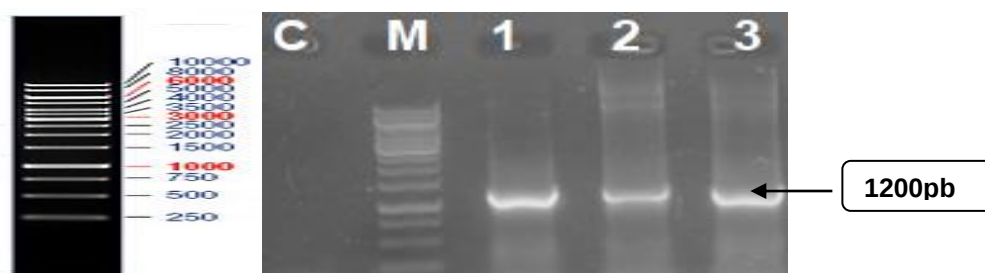
A análise estatística foi realizada utilizando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do pós-teste de correção de Bonferroni utilizando o *software* GraphPad Prism. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

5.1 AMPLIFICAÇÃO DAS LCRS DO HPV-31

Depois da escolha dos três isolados, a etapa inicial foi realizar a amplificação a partir das três amostras clínicas positivas para o HPV-31 (isolados 89, 21 e 66) (Figura 12). O gel da figura 8 mostra um amplicon de 1200 pb, porém a LCR do HPV-31 possui 846pb, os *primers* desenhados se anelaram em regiões nos genes L1 e E6 inicialmente fazendo com que o tamanho do amplicon final aumentasse. É importante que isso ocorra, pois é mais uma garantia que na etapa do sequenciamento a sequência de interesse seja analisada corretamente.

Figura 12. Gel representativo demonstrando a amplificação da região LCR variante com o uso de *primers* específicos LCR do HPV-31. C: Controle negativo; M: Marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder- Thermo Scientific); 1, 2 e 3: amplificação da região LCR dos isolados 21, 66 e 89.



5.2 CLONAGEM, SUBCLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DAS SEQUÊNCIAS VARIANTES DA REGIÃO LCR DO HPV-31

Após a amplificação as amostras foram ligadas no plasmídeo pGEM-T easy (Promega) e confirmados por ensaio de restrição (Figura 13) conforme descrito no item 4.4 da metodologia. Posteriormente cada produto da digestão foi utilizado numa reação de ligação no vetor de expressão em células de mamífero pNL1.1 (Promega) e confirmados por ensaio de restrição (Figura 14). Além disso, todos os clones recombinantes obtidos foram submetidos a reações de sequenciamento para a confirmação da integridade das sequências variantes da LCR HPV-31 através da comparação dessas sequências com as sequências de referência depositadas no GenBank (HPV-31 – J04353.1).

Figura 13. Confirmação da clonagem LCR HPV-31 variantes por digestão no pGEM-T easy. M: Marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder- Thermo Scientific); 1, 2 e 3: Digestão enzimática com liberação do vetor e inserto(região LCR dos isolados 21, 66 e 89) através das enzimas XhoI (Temperatura ótima 37°C, Promega) e HindIII (Temperatura ótima 37°C, Promega).

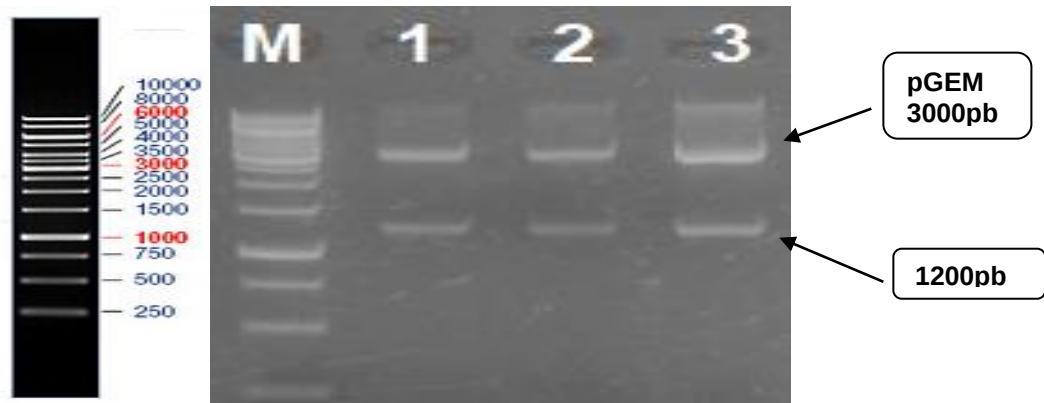
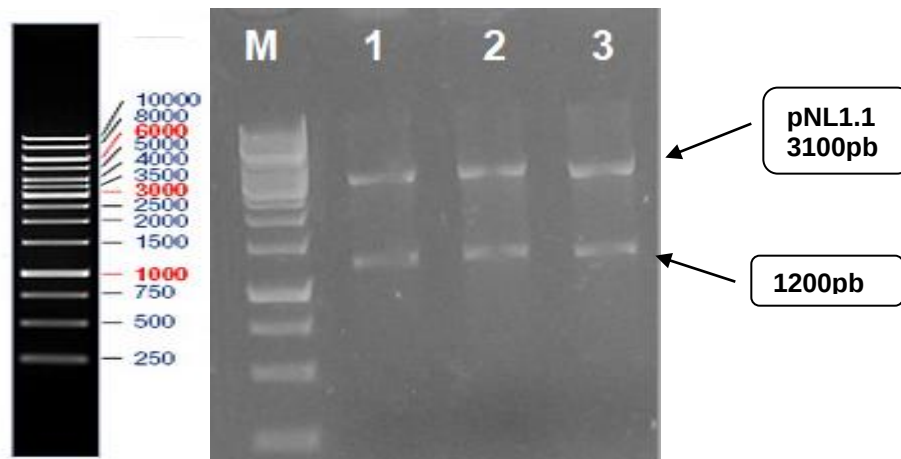


Figura 14. Confirmação da clonagem LCR HPV-31 variantes por digestão no pNL1.1. M: Marcador (GeneRuler 1 KB DNA Ladder- Thermo Scientific); 1, 2 e 3: Digestão enzimática com liberação do vetor e inserto(região LCR dos isolados 21, 66 e 89) através das enzimas XhoI (Temperatura ótima 37°C, Promega) e HindIII (Temperatura ótima 37°C, Promega).



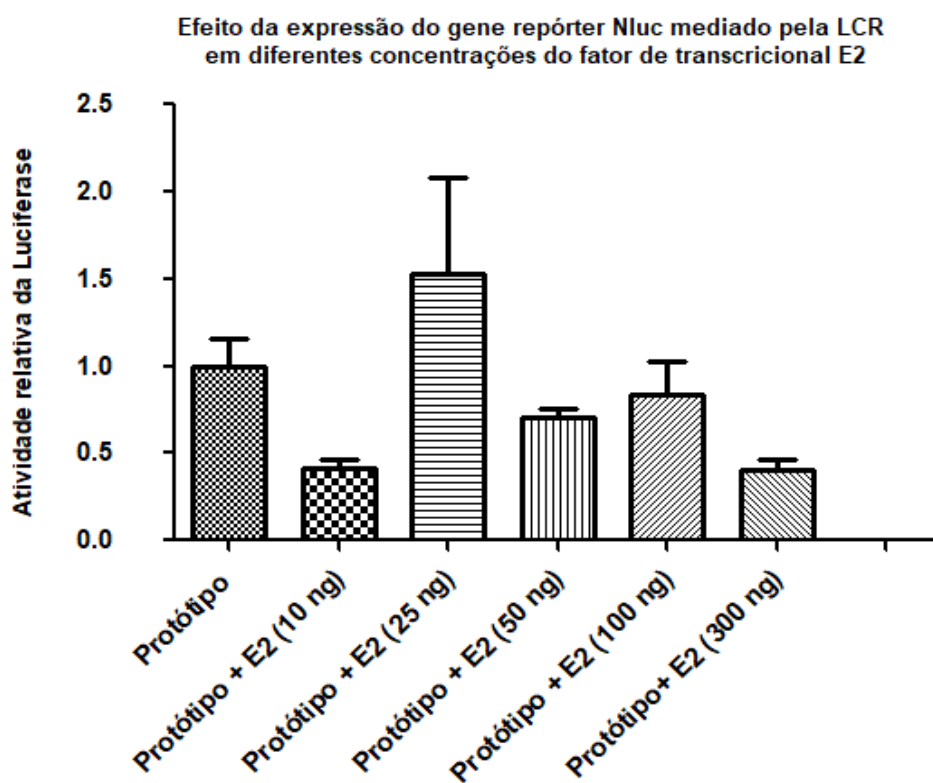
5.3 TRANSFEÇÃO *IN VITRO* DE CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Após a confirmação da subclonagem no vetor de expressão, o DNA dos vetores recombinantes contendo LCR-31 variantes foram isolados por maxi-preparação e os produtos da maxi-preparação foram utilizados para transfecção das células eucarióticas HeLa. Para a primeira etapa da transfecção a viabilidade celular foi de 91,7 % e na segunda etapa a viabilidade das células foi de 92%.

5.4 ENSAIOS DE LUCIFERASE

Para investigarmos qual a concentração ideal do regulador transcricional E2 que melhor ativa a LCR, células HeLa foram co-transfectadas com o plasmídeo contendo o regulador E2 nas concentrações 10ng, 25ng, 50ng, 100ng e 300ng e a LCR protótipo na concentração de 100ng. Os resultados apresentados no gráfico (Figura 15) mostram que a concentração do regulador transcricional E2 que deve ser usada é a de 25ng, pois foi a que melhor ativou o promotor, observou-se também que a concentração de 300ng reprimiu a atividade da LCR.

Figura 15: Grupo de células HeLa foram co-transfectadas com a LCR protótipo do HPV-31, o plasmídeo Renilla e com o plasmídeo contendo o regulador transcricional E2 na concentração de 10ng, 25ng, 50ng, 100ng e 300ng. Após quarenta e oito horas da transfecção as células foram lisadas e os extratos celulares foram preparados para leitura da luciferase de *NanoLuc* e *renilla*.

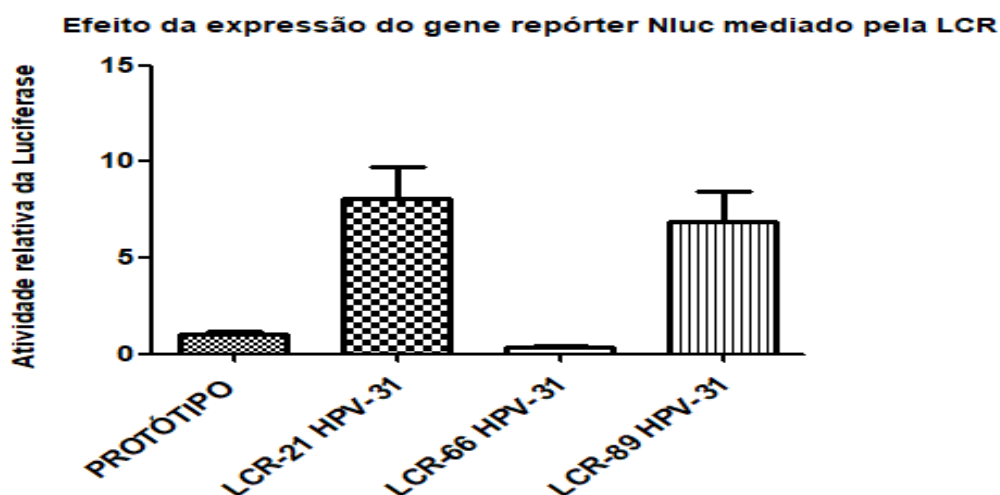


Depois que foi estabelecida a concentração do regulador E2, realizou-se uma nova transfecção para avaliar os efeitos das variantes da LCR do HPV-31, nessa etapa células HeLa foram co-transfectadas com as LCR polimórficas ou protótipo subclonadas no vetor de expressão pNL1.1 que contém o gene repórter *Nluc*, cuja a expressão está condicionada pela LCR, um plasmídeo expressando Renilla

luciferase como normalizador e o plasmídeo com o regulador E2 na concentração de 25ng, este último presente apenas nas LCR polimórficas. Os resultados apresentados no gráfico (Figura 16) mostram que os polimorfismos na LCR HPV-31 dos isolados 21 - variante C - (apresentando lesão de alto grau - neoplasia intraepitelial cervical grau II), 66 - variante A - (apresentando lesão de alto grau - neoplasia intraepitelial cervical grau III) e 89 - variante C - (apresentando lesão de alto grau - neoplasia intraepitelial cervical grau III) colaboraram para alterações nos níveis de expressão do gene repórter *Nluc*.

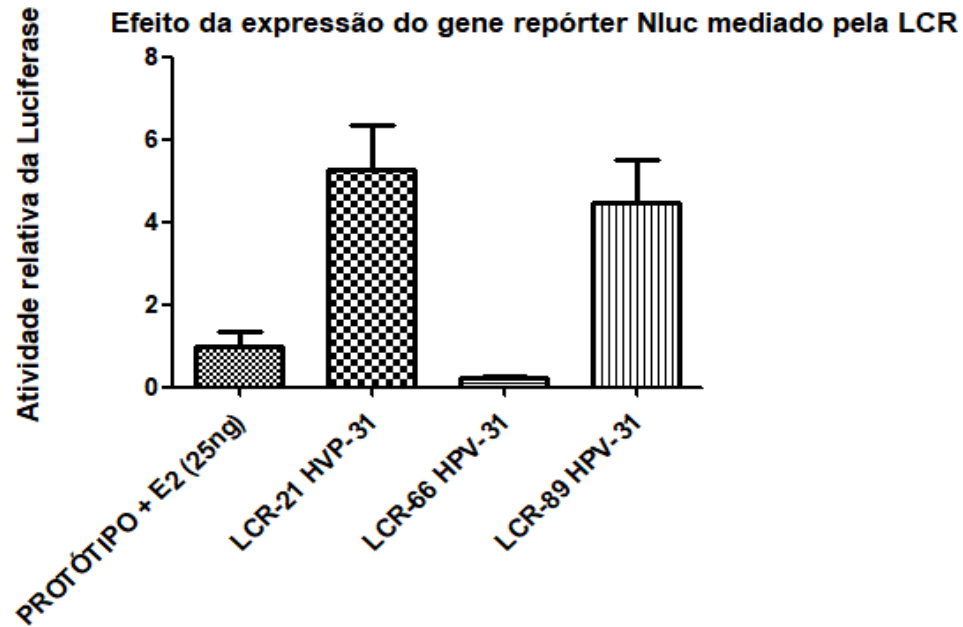
Os isolados 21 e 89 possuem a mesma deleção na posição 7330-7339, mas alguns polimorfismos diferem um isolado do outro, o isolado 89 possui alterações em dois sítios de ligação para o fator transcricional E2 e três polimorfismos a mais que o isolado 21 relacionados com locais de ligação com os fatores AP1 e NF1. O isolado 21 além da deleção e alterações nos locais de ligação para os fatores AP1, NF1, YY1, possui polimorfismos em três locais de ligação para o regulador transcricional E2. O isolado 66 apresenta apenas uma deleção na posição 7335-7339. O gráfico mostra que o isolado 21 possui uma LCR com maior capacidade de alterar os níveis de expressão do gene repórter *Nluc* e que o isolado 66 teve os níveis de expressão do gene repórter *Nluc* diminuídos comparado com o controle (LCR- protótipo). A análise estatística mostrou diferença significativa entre as LCRs polimórficas (isolados 21, 66 e 89) e o controle (LCR protótipo do HPV-31) com valor de $p < 0.0001$.

Figura 16: Grupo de células HeLa foram co-transfectadas com a LCR polimórfica do HPV-31, ou com a LCR protótipo do HPV-31, o plasmídeo Renilla e com o plasmídeo contendo o regulador transcricional E2 na concentração de 25 ng apenas nas LCRs polimórficas. Após quarenta e oito horas da transfecção as células foram lisadas e os extratos celulares foram preparados para leitura da luciferase de *NanoLuc* e *renilla*.



A última transfecção foi realizada para avaliar o efeito da LCR protótipo com a presença do regulador transcricional E2. O experimento seguiu o princípio da transfecção descrita anteriormente, porém agora o grupo de células HeLa foram co-transfectadas com a LCR polimórfica do HPV-31, ou com a LCR protótipo do HPV-31, o plasmídeo Renilla e com o plasmídeo contendo o regulador transcricional E2 na concentração de 25 ng em todas as condições. O resultado do gráfico (Figura 17) mostrou que o regulador transcricional E2 co-transfectado com o protótipo alterou os níveis de expressão do gene repórter *Nluc* comparado com os experimentos do gráfico anterior (Figura13). A análise estatística mostrou diferença significativa entre as LCRs polimórficas (isolados 21, 66 e 89) e o controle (LCR protótipo do HPV-31) com valor de $p=0.0002$.

Figura 17: Grupo de células HeLa foram co-transfectadas com a LCR polimórfica do HPV-31, ou com a LCR protótipo do HPV-31, o plasmídeo Renilla e com o plasmídeo contendo o regulador transcricional E2 na concentração de 25 ng em todas as condições. Após quarenta e oito horas da transfecção as células foram lisadas e os extratos celulares foram preparados para leitura da luciferase de *NanoLuc* e *renilla*.



6 DISCUSSÃO

Muitos estudos reforçam a importância das variantes dos HPVs 16, 31 e 58, pelo motivo de afetarem a oncogenicidade, progressão e persistência da infecção pelo vírus (Londesborough et al., 1996; Yamada et al., 1997; Ho et al., 2005; Sichero et al., 2007; Xi et al., 2007; Villa et al., 2000; Quint et al., 2010; Schiffman et al., 2010; Gheit et al., 2011; Zehbe et al., 2011; Zuna et al., 2011; Chang et al., 2011; Chansaenroj et al., 2012; Burroni et al., 2013; Cornet et al., 2013). Desta forma, a análise molecular e funcional das variantes dos HPVs são importantes, considerando-se o risco de persistência da infecção viral e suscetibilidade para o desenvolvimento de lesões (Villa, 2006; Villa et al., 2000; Sichero et al., 2007). Porém, mesmo com a reconhecida importância dos estudos de análise funcional e variabilidade genética, existem poucos trabalhos com amostras do Brasil em especial do Nordeste (Freitas et al., 2012; Chagas et al., 2013; Gurgel et al., 2013). No estudo aqui apresentado foi investigado os efeitos dos polimorfismos encontrados na LCR variantes do HPV-31. Variações na LCR podem influenciar a progressão do câncer cervical, resultando na perda da capacidade de ligação dos fatores transcricionais E2, YY1, NF-1, AP1. Nesta perspectiva, estudos têm sugerido que variações na LCR conferem um aumento no risco de infecções persistentes causadas pelos tipos de HPVs 16, 18, 33 (Gagnon *et al.*, 2004) e 58 (Raiol *et al.*, 2011).

A região LCR onde existem sequências estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além da sequência de origem de replicação, possui informações filogenéticas mais complexas e por isso é distinguida em variantes e sublinhagem (Cornet et al., 2012). Existem três variantes (A, B e C) para a LCR do HPV-31 (Liu M et al., 2014). As variantes A e B são consideradas mais oncogênicas quando comparadas com a variante C (Xi et al., 2012). As variantes da LCR do HPV-31 utilizadas neste estudo foram identificadas pelo nosso grupo no trabalho já publicado "Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16, HPV31, and HPV58 found in North-East Brazil". A LCR do isolado 66 pertence a variante A e a dos isolados 21 e 89 pertencem a variante C. O trabalho de Gurgel et al (2015) reportou a presença das variantes A e

C, semelhante ao estudo de Chagas et al (2011 e 2013) que observou uma maior frequência das variantes A e C e baixa frequência da variante B, ambos trabalhos no Nordeste brasileiro. Um estudo realizado com mulheres chinesas também foi observado a presença das variantes A e C enquanto que a variante B foi raramente detectada (Liu et al., 2014).

O presente estudo relata pela primeira vez uma análise funcional de variantes da LCR do HPV-31 em amostras de mulheres do estado de Pernambuco. Muitos estudos envolvendo a LCR do HPV-31 fizeram apenas a investigação da presença de polimorfismos (Gagnon et al., 2005; Raiol et al., 2009; Cornut et al., 2010; Cento et al., 2011; Chen et al., 2011). O nosso resultado apresenta o efeito da expressão do gene repórter *Nluc* condicionado pela LCR, em que é observado que a LCR do isolado 21 pertencente a variante C é o que mais ativa a expressão do gene repórter *Nluc* comparado com o controle (protótipo). O isolado 89 também pertencente à variante C possui um comportamento semelhante ao isolado 21, porém, a capacidade de alterar os níveis de expressão do gene repórter *Nluc* foi reduzida, e o isolado 66 possuindo uma LCR classificada como variante A reprimiu a expressão do gene repórter, ficando inferior ao controle. Um estudo envolvendo mulheres na Hungria realizou uma análise funcional de variantes da LCR do HPV-31, onde os resultados obtidos foram semelhantes aos resultados observados no presente trabalho, com amostras pertencentes a variante A apresentando uma maior repressão do gene repórter, enquanto que amostras das variantes B e C apresentaram maior expressão do gene repórter quando comparados ao protótipo (Annamaria et al., 2013).

Nossos resultados para determinar a concentração ideal do regulador transcricional E2 que melhor ativa a LCR, corroboram com os dados encontrados por Hang e colaboradores (2013), onde em baixas concentrações (25ng) do fator de transcrição E2 ocorre a ativação da expressão dos oncogenes, neste caso ativando a expressão do gene repórter *Nluc*, e em altas concentrações (300ng) a expressão do gene repórter foi diminuída.

Além de avaliar os resultados funcionais no nível de variantes é importante associá-los com os polimorfismos encontrados nos isolados, pois eles podem interferir com a progressão do câncer cervical alterando a ligação com os fatores

transcricionais. As variações encontradas na LCR dos isolados estão localizadas em sítios de ligação para fatores transcricionais (E2, YY1, NF-1 e AP1). Os fatores AP1 e NF1 ativam e o fator YY1 inibe a expressão dos oncogenes virais (Sichero; Sobrinho; Villa, 2012). O fator transcricional E2 é um ativador em baixas concentrações e um repressor em altas concentrações (Thierry e Yaniv, 1987; Bouvard et al., 1994; Schweiger et al., 2007., Hang et al., 2013). O isolado 21 apresenta alterações em três sítios dos quatro locais existentes para ligação com o fator de transcrição E2, além de seis locais alterados localizados em sítios de ligação para o YY1, dois para o NF-1 e um para AP1. O isolado 89 possui duas alterações em locais de ligação para o fator E2, seis em locais para o YY1, três para o NF-1 e dois para o AP1. O isolado 66 apresentou apenas uma deleção na posição 7335-7344 que não está inserida em sítios de ligação para fatores transcricionais, assim como a deleção presente nos outros dois isolados. Um estudo realizado com mulheres italianas identificou vários polimorfismos na LCR do HPV-31, muitos deles encontrados nos isolados apresentados neste trabalho. Na posição 7449 (G para A), 7457 (G para A) referentes a locais de ligação com o fator YY1 e 7474 (C para T) com sítio de ligação do fator E2 (Cento et al., 2011).

O diferencial deste trabalho é que nós avaliamos funcionalmente as variantes e as alterações presentes em cada uma delas, mostrando que polimorfismos em sítios de ligação para fatores de transcrição resultam em ganho ou diminuição da expressão dos oncogenes virais. A variante C mostrou-se potencialmente mais oncogênica, diferente do encontrado por Xi et al (2012). É necessário que se tenha mais estudos avaliando individualmente os fatores de transcrição para afirmar com maior clareza as alterações de cada fator nas variantes do HPV-31.

7 CONCLUSÃO

- O estudo apresentado amplia o conhecimento sobre as variantes do Papilomavírus Humano, com base em polimorfismos identificados na região LCR do HPV-31, circulantes no estado de Pernambuco, região Nordeste do Brasil. Neste estudo foi observado que os polimorfismos na LCR do HPV-31 do isolado 21 e 89 colaboraram para uma maior expressão do gene repórter *Nluc*, enquanto que os polimorfismos na LCR do isolado 66 reprimiu a atividade do gene repórter *Nluc* comparado com o controle.
- Os efeitos das concentrações do regulador transcricional E2 na expressão do gene repórter *Nluc* corroboram com os dados da literatura, onde baixas concentrações do E2 ocorre a ativação da expressão dos oncogenes, neste caso ativando a expressão do gene repórter *Nluc*, e em altas concentrações a expressão do gene repórter foi diminuída.
- A identificação de polimorfismos para a região LCR do HPV-31 já são descritos em outras populações do mundo, mas sem dados publicados em nossa população, assim começa a ser traçado um perfil mais refinado de variantes do HPV e sua importância para o prognóstico de lesões cervicais.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, T. R. et al. New HPV-16 European and non-European variants in Central Brazil. **Virus Genes**, v. 35, p. 1–4, 18 out. 2006.
- AMARAL, CM, Cetkovská K, Gurgel AP, Cardoso MV, Chagas BS, Paiva Júnior SS, de Lima Rde C, Silva-Neto JC, Silva LA, Muniz MT, Balbino VQ, Freitas AC (2014) MDM2 polymorphism associated with the development of cervical lesions in women infected with Human papillomavirus and using of oral contraceptives. **Infect Agent Cancer**. 9:24.
- ANNAMARIA, Ferenczi Eszter Gyo'ngyosi, Anita Szalm s, Zoltan Herna di, Zoltan To th, Jozsef Konya and Gyorgy Veress. Sequence Variation of Human Papillomavirus Type 31 Long Control Region: Phylogenetic and Functional Implications. **Journal of Medical Virology** 85:852–859 (2013)
- APPLE, RJ, Erlich HA, Klitz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM (1994) HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. **Nat Genet**. 6(2):157-62.
- BALDEZ, da Silva MF, Chagas BS, Guimarães V, Katz LM, Felix PM, Miranda PM, Lima AA, Arraes LC, Martins DB, Lima Filho JL, Stocco RC, Crovella S, Freitas AC, Beçak W (2009) HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil. **Genet Mol Res**. 8(4):1437-43.
- BARZON, L, Giorgi C, Buonaguro FM, Palù G (2008) Guidelines of the Italian Society for Virology on HPV testing and vaccination for cervical cancer prevention. **Infect Agent Cancer**. 3:14
- BERNARD, HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**. 2010; 401(1):70–79. doi: 10.1016/j.virol.2010.02.002. [PubMed: 20206957]
- BERNARD, H.U. Regulatory elements in the viral genome. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 197–204, out. 2013.
- BOSCH, FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J Natl Cancer Inst**. 87(11):796-802
- BOSCH, FX, Muñoz N (2002) The viral etiology of cervical cancer. **Virus Res**. 89(2):183-90.
- BOUVARD, V, Storey A, Pim D, Banks L. 1994. Characterization of the human papillomavirus E2 protein: Evidence of trans-activation and trans-repression in cervical keratinocytes. **EMBO J** 13:5451–5459.

BURD, EM (2003) Human papillomavirus and cervical cancer. **Clin Microbiol Rev** 16:1-17.

BURK, RD, Harari A, Chen Z (2013) Human papillomavirus genome variants. **Virology**. 445(1-2):232-43.

BURRONI, E. et al. Codon 72 polymorphism of p53 and HPV type 16 E6 variants as risk factors for patients with squamous epithelial lesion of the uterine cervix. **Journal of medical virology**, v. 85, n. 1, p. 83–90, jan. 2013.

CASTRO, M. M. et al. Prevalence of human papillomavirus (HPV) type 16 variants and rare HPV types in the central Amazon region. **Genetics and Molecular Research: GMR**, v. 10, n. 1, p. 186–196, 2011.

CENTO, V. et al. Intratype variations of HPV 31 and 58 in Italian women with abnormal cervical cytology. **Journal of Medical Virology**, v. 83, n. 10, p. 1752–1761, out. 2011.

CHAGAS, B. S. et al. New variants of E6 and E7 oncogenes of human papillomavirus type 31 identified in Northeastern Brazil. **Gynecologic Oncology**, v. 123, n. 2, p. 284–288, nov. 2011.

CHAGAS, B. S. et al. Novel E6 and E7 oncogenes variants of human papillomavirus type 31 in Brazilian women with abnormal cervical cytology. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 16, p. 13–18, jun. 2013.

CHANG, Y.-J. et al. Unique variants of human papillomavirus genotypes 52 and 58 and risk of cervical neoplasia. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 129, n. 4, p. 965–973, 15 ago. 2011.

CHANSAENROJ, J. et al. Whole genome analysis of human papillomavirus type 16 multiple infection in cervical cancer patients. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 13, n. 2, p. 599–606, 2012.

CHEN, Z. et al. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. **PloS One**, v. 6, n. 5, p. e20183, 2011.

CLIFFORD, GM, Gallus S, Herrero R, Muñoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, Anh PT, Ferreccio C, Hieu NT, Matos E, Molano M, Rajkumar R, Ronco G, de Sanjosé S, Shin HR, Sukvirach S, Thomas JO, Tunsakul S, Meijer CJ, Franceschi S; IARC HPV Prevalence Surveys Study Group. (2005) Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. **Lancet**. 366(9490):991-8

CLIFFORD, GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S (2003) Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. **Br J Cancer**. 89(1):101-5.

COMBITA, AL, Touzé A, Bousarghin L, Sizaret PY, Muñoz N, Coursaget P (2001) Gene transfer using human papillomavirus pseudovirions varies according to virus genotype and requires cell surface heparan sulfate. **FEMS Microbiol Lett**. 204(1):183-8.

CORNET, I. et al. Human papillomavirus type 16 genetic variants: phylogeny and classification based on E6 and LCR. **Journal of virology**, v. 86, n. 12, p. 6855–6861, jun. 2012.

CORNUT, G. et al. Polymorphism of the capsid L1 gene of human papillomavirus types 31, 33, and 35. **Journal of Medical Virology**, v. 82, p. 1168–1178, jul. 2010.

CRUZ, MR, Cerqueira DM, Cruz WB, Camara GNL, Brígido MM, Silva EO, Carvalho LGS, Martins CRF (2004). Prevalence of Human Papillomavirus Type 16 Variants in the Federal District , Central Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 99(3): 281-282.

CUBIE, HA (2013) Diseases associated with human papillomavirus infection. **Virology**. 445(1-2):21-34.

DE SANJOSÉ, S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX (2007) Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. **Lancet Infect Dis**. 7(7):453-9.

DE SANJOSE, S. et al. Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 11, p. 1048–1056, nov. 2010.

DE VILLIERS, EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. **Virology**. 324(1):17-27.

DE VILLIERS, EM, Sandstrom RE, zur Hausen H, Buck CE (2005) Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. **Breast Cancer Res**. 7(1):1-11.

DONG, Hang, Lei Gao, Min Sun, Ying Liu, and Yang Ke. Functional Effects of Sequence Variations in the E6 and E2 Genes of Human Papillomavirus 16 European and Asian Variants. **Journal of Medical Virology** 86:618–626 (2014).

DONG, X. P.; Pfister, H. Overlapping YY1- and aberrant SP1-binding sites proximal to the early promoter of human papillomavirus type 16. **The Journal of General Virology**, v. 80 (Pt 8), p. 2097–2101, ago. 1999.

DOORBAR, J (2005) The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol**.32(1):S7-15. Review.

DOORBAR J (2006) Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. **Clin Sci (Lond)**. 110(5):525-41. Review

DOORBAR J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine**. 30(5):55-70

DOORBAR, J. The E4 protein; structure, function and patterns of expression. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 80–98, out. 2013.

EFIRD, JT, Toland AE, Lea CS, Phillips CJ (2011) The combined influence of oral contraceptives and human papillomavirus virus on cutaneous squamous cell carcinoma. **Clin Med Insights Oncol**. 5:55-75.

EVANDER M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA.(1997) Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. **J Virol**. 71(3):2449-56.

FEHRMANN, F and Laimins LA (2003) Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. **Oncogene** 22:5201-5207.

FERNANDES, J. V. et al. Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil. **BMC Research Notes**, v. 3, n. 1, p. 96, 8 abr. 2010.

FERNANDES, T. A. A. DE M. et al. Human papillomavirus infection in women attended at a cervical cancer screening service in Natal, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 573–578, set. 2008a.

FREITAS, AC, Gurgel AP, Chagas BS, Coimbra EC, do Amaral CM. (2012) Susceptibility to cervical cancer: an overview. **Gynecol Oncol**. 126(2):304-11.

GAGNON, S. et al. Polymorphism of the L1 capsid gene and persistence of human papillomavirus type 52 infection in women at high risk or infected by HIV. **Journal of acquired immune deficiency syndromes** (1999), v. 44, n. 1, p. 61–65, 1 jan. 2007.

GHANEM, KG, Datta SD, Unger ER, Hagensee M, Shlay JC, Kerndt P, Hsu K, Koutsky LA (2011) The association of current hormonal contraceptive use with type-specific HPV detection. **Sex Transm Infect**. 87(5):385-8

GHEIT, T. et al. Risks for persistence and progression by human papillomavirus type 16 variant lineages among a population-based sample of Danish women. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research**, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, v. 20, n. 7, p. 1315–1321, jul. 2011.

GIROGLOU, T, Florin L, Schäfer F, Streeck RE, Sapp M (2001) Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. **J Virol**. 75(3):1565-70.

GRAHAN, SV (2010) Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. **Future Microbiol** 5(10): 1493–1506.

GURGEL, AP, Chagas BS, do Amaral CM, Albuquerque EM, Serra IG, Silva Neto Jda C, Muniz MT, de Freitas AC (2013) Prevalence and genetic variability in capsid L1 gene of rare human papillomaviruses (HPV) found in cervical lesions of women from North-East Brazil. **Biomed Res Int.** 2013:546354.

GURGEL, AP, Chagas BS, do Amaral CM, Nascimento KC, Leal LR, Silva Neto J da C, Cartaxo Muniz MT, de Freitas AC (2015) Prevalence of human papillomavirus variants and genetic diversity in the L1 gene and long control region of HPV16, HPV31, and HPV58 found in North-East Brazil. **Biomed Res Int.** 130828.

HO, C.-M. et al. Detection and quantitation of human papillomavirus type 16, 18 and 52 DNA in the peripheral blood of cervical cancer patients. **Gynecologic Oncology**, v. 99, n. 3, p. 615–621, dez. 2005.

INCA (2016) Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Ministério da Saúde, **Instituto Nacional do Câncer**, Brasil. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2017>. Acesso em: 21 outubro.2017

JEMAL, A. et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2009, Featuring the Burden and Trends in Human Papillomavirus (HPV)–Associated Cancers and HPV Vaccination Coverage Levels. **Journal of the National Cancer Institute**, p. djs491, 7 jan. 2013.

JOHNSON, KM, Kines RC, Roberts JN, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2009) Role of heparan sulfate in attachment to and infection of the murine female genital tract by human papillomavirus. **J Virol.** 83(5):2067-74.

KALANTARI M, Chase DM, Tewari KS, Bernard HU (2010) Recombination of human papillomavirus-16 and host DNA in exfoliated cervical cells: a pilot study of L1 gene methylation and chromosomal integration as biomarkers of carcinogenic progression. **J Med Virol.** 82(2):311-20.

KINES, RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM (2009) The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 106(48):20458-63.

KISSELJOV, FL (2000) Virus-associated human tumors: cervical carcinomas and Li J, Mei J, Wang X, Hu L, Lin Y, Yang P (2012) Human papillomavirus type-specific prevalence in women with cervical intraepithelial neoplasm in Western China. **J Clin Microbiol.** 50(3):1079-81

LICITRA, L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggionni M, Rossini C, Cantù G, Squadrelli M, Quattrone P, Locati LD, Bergamini C, Olmi P, Pierotti MA, Pilotti S (2006) High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. **J Clin Oncol.** 24(36):5630-6

LIN, BY, Makhov AM, Griffith JD, Broker TR and Chow LT (2002) Chaperone proteins abrogate inhibition of the human papillomavirus (HPV) E1 replicative helicase by the HPV E2 protein. **Mol Cell Biol** 22:6592-6604.

LIU, J. et al. Variations of human papillomavirus type 58 E6, E7, L1 genes and long control region in strains from women with cervical lesions in Liaoning province, China. Infection, genetics and evolution: **Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 12, n. 7, p. 1466–1472, out. 2012.

LONDESBOROUGH, P. et al. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. International Journal of Cancer. **Journal International Du Cancer**, v. 69, n. 5, p. 364–368, 21 out. 1996.

LORENZATO, F, Ho L, Terry G, Singer A, Santos LC, De Lucena Batista R, Lubambo T (2000) The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). **Int J Gynecol Cancer**. 10(2):143-150

MACIAG, PC, Schlecht NF, Souza PS, Rohan TE, Franco EL, Villa LL (2002) Polymorphisms of the human leukocyte antigen DRB1 and DQB1 genes and the natural history of human papillomavirus infection. **J Infect Dis**. 186(2):164-72.

MACLAUGHLAN, SD, Lachance JA, Gjelsvik A (2011) Correlation between smoking status and cervical cancer screening: a cross-sectional study. **J Low Genit Tract Dis**. 15(2):114-9.

MCBRIDE, A. A. The Papillomavirus E2 proteins. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1–2, p. 57–79, out. 2013.

MCCANCE DJ (2005) Transcriptional regulation by human papillomaviruses. **Curr Opin Genet Dev**. 15(5):515-9. Review.

MOKTAR, A, Singh R, Vadhanam MV, Ravoori S, Lillard JW, Gairola CG, Gupta RC (2011) Cigarette smoke condensate-induced oxidative DNA damage and its removal in human cervical cancer cells. **Int J Oncol**. 39(4):941-7.

MUÑOZ, N (2006) New perspective for cervical cancer prevention based on human papillomavirus. **Biomedica**. 26(4):471-4

O'CONNOR, M.; BERNARD, H.-U. Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interaction with NFI at a conserved composite regulatory element. **Scopus**, 1995.

PEIRSON, L, Fitzpatrick-Lewis D, Ciliska D, Warren R (2013) Screening for cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. **Syst Rev** 2:35.

QUINT, K. D. et al. HPV genotyping and HPV16 variant analysis in glandular and squamous neoplastic lesions of the uterine cervix. **Gynecologic oncology**, v. 117, n. 2, p. 297–301, maio 2010.

RAIOL, T. et al. Genetic variability and phylogeny of the high-risk HPV-31, -33, -35, -52, and -58 in central Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 81, p. 685–692, abr. 2009.

SAAVEDRA, KP, Brebi PM, Roa JC (2012) Epigenetic alterations in preneoplastic and neoplastic lesions of the cervix. **Clin Epigenetics**. 4(1):13.

SAPP, M, Day PM (2009) Structure, attachment and entry of polyoma- and papillomaviruses. **Virology**. 384(2):400-9.

SCHEURER, M.E, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K (2005) Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **Int J Gynecol Cancer**. 15(5):727-46. Review.

SCHIFFMAN M, Solomon D (2009) Screening and prevention methods for cervical cancer. **JAMA**. 302(16):1809-10.

SCHIFFMAN, M. et al. A Population-Based Prospective Study of Carcinogenic Human Papillomavirus Variant Lineages, Viral Persistence, and Cervical Neoplasia. **Cancer Research**, v. 70, n. 8, p. 3159 –3169, Abril 2010.

SCHWEIGER, MR, Ottinger M, You J, Howley PM. 2007. Brd4- independent transcriptional repression function of the papillomavirus e2 proteins. **J Virol** 81:9612–9622.

SICHERO, L. et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. *International Journal of Cancer*. **Journal International Du Cancer**, v. 120, n. 8, p. 1763–1768, 15 abr. 2007.

SICHERO, L.; SOBRINHO, J. S.; VILLA, L. L. Identification of Novel Cellular Transcription Factors that Regulate Early Promoters of Human Papillomavirus Types 18 and 16. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 6, p. 867–874, 15 set. 2012.

SILVA, A.M.T, Amaral MVT and Cruz AD (2003) HPV e câncer: O papel do papilomavírus humano na carcinogênese. *Biotechnol Ciênc Desenvol* 29:48-54.
Staden, R. The Staden sequence analysis package. **Molecular biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 233–241, jun. 1996.

STEENBERGEN, RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ (2005) HPV-mediated transformation of the anogenital tract. **J Clin Virol**. 32(1): 25-33.

SURVILADZE, Z, Sterk RT, DeHaro SA, Ozbun MA (2013) Cellular entry of human papillomavirus type 16 involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway and inhibition of autophagy. **J Virol**. 87(5):2508-17.

TAN, SH, Bartsch D, Schwarz E, Bernard HU (1998) Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus type 16 point toward conservation of these genomic elements in all genital papillomaviruses. **J Virol** 72(5):3610-22.

THIERRY, F, Yaniv M. 1987. The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. **EMBO J** 6:3391-3397.

TRIMBLE, C.L, Piantadosi S, Gravitt P, Ronnett B, Pizer E, Elko A, Wilgus B, Yutzy W, Daniel R, Shah K, Peng S, Hung C, Roden R, Wu TC, Pardoll D (2005) Spontaneous regression of high-grade cervical dysplasia: effects of human papillomavirus type and HLA phenotype. **Clin Cancer Res**. 11(13):4717-23.

VILLA, L. L. et al. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. **The Journal of General Virology**, v. 81, n. Pt 12, p. 2959–2968, dez. 2000.

WALBOOMERS, J.M, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. **J Pathol**. 189(1):12-9.

WARD, K.K, Berenson AB, Breitkopf CR (2011) Passive smoke exposure and abnormal cervical cytology in a predominantly Hispanic population. **Am J Obstet Gynecol**. 204(3):213.e1-6.

WOODMAN, C.B, Collins SI, Young LS (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer** 7(1):11-22.

WOODMAN, CB, Collins SI, Young LS (2007) The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer** 7(1):11-22.

XI, L. F. et al. Association of human papillomavirus type 31 variants with risk of cervical intraepithelial neoplasia grades 2-3. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 131, n. 10, p. 2300–2307, 15 nov. 2012.

XI, L. F. et al. Risk for high-grade cervical intraepithelial neoplasia associated with variants of human papillomavirus types 16 and 18. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 16, n. 1, p. 4–10, jan. 2007.

YAMADA, T. et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers papillomaviruses. **Biochemistry** 65:68-77.

ZEHBEL, I. et al. p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. **Cancer Research**, v. 61, n. 2, p. 608–611, 15 jan. 2001.

ZIGUI, Chen, Luciana Bueno de Freitas, and Robert D. Burk. Evolution and classification of oncogenic human papillomavirus types and variants associated with cervical cancer. **Methods Mol Biol**. 2015 ; 1249: 3–26. doi:10.1007/978-1-4939-2013-6_1.

ZUNA, R. E. et al. HPV16 variant lineage, clinical stage, and survival in women with invasive cervical cancer. **Infectious Agents and Cancer**, v. 6, n. 1, p. 19, 28 out. 2011.

ZUR, Hausen H (2002) Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**. 2(5):342-50. Review.

ZUR, Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. **J Natl Cancer Inst**. 2000;92(9):690-8.